Revue d'Immunologie, tome **33**, 1969, n° 4-5, pp. 177 à 227

MÉMOIRES ORIGINAUX

Recherches sur les principaux *Aspergillus* pathogènes (*)

par

P. BOUTIBONNES

(Caen)

1970

I. — INTRODUCTION

En 1729, dans son ouvrage « *Nova Plantarum Genera* », MICHELI (59) cite pour la première fois le nom d'*Aspergillus*, mais il faut attendre le XIX^e^ siècle et les travaux de mycologues comme LINK (56), CORDA (23), FRESENIUS (30), de BARY (6), van TIEGHEM (97) pour voir s'articuler, au sein de ce genre, une ébauche de classification. A cette époque, ces moisissures, essentiellement caractérisées par la production, sur des hyphes mycéliens rampants, d'appareils conidiens dressés, prenant naissance à partir d'une fraction du thalle isolée par 2 septa, sont surtout connues comme agents de processus de décomposition, de fermentation et occasionnellement comme responsables de maladies humaines ou animales (82). WEHMER (107), au début du siècle, THOM (98, 99), puis plus récemment RAPER et FENNELL (80) établissent sur la base de critères morphologiques une systématique complète du genre.

Exploités à cause de leurs importantes propriétés enzymatiques — il n'en faut pour preuve que les travaux très anciens sur la takadiastase (95, 15) — pour la préparation de certaines denrées alimentaires (77); étudiés de près par les chercheurs de l'école d'Oxford dès 1940 (27) en vue de la synthèse industrielle d'acides organiques et d'antibiotiques; redoutés par le vétérinaire et le médecin parce qu'ils provoquent des mycoses superficielles (otomycose) (51) ou profondes comme l'aspergillose pulmonaire (37, 52, 57, 81), dont les cas cliniques sont chaque année plus

(*) Mémoire faisant partie des travaux présentés pour la soutenance d'une thèse de Doctorat ès Sciences enregistrée au C.N.R.S. sous le n° AO 2743. Laboratoire de Microbiologie. Faculté des Sciences de Caen. Professeur J. JACQUET.

nombreux; les *Aspergillus* suscitent, à la suite de la découverte récente (88, 89) d'une toxine à puissante action cancérigène secrétée par certains d'entre eux, une énorme vague d'intérêt dans le monde entier. Mais il y a, aussi, d'autres mycotoxines produites par les espèces pathogènes du groupe comme la néphrotoxine d'*A. fumigatus* (86, 100, 101) ou le principe hémolytique d'*A. clavatus* que nous avons précédemment signalé (45) et dont la présence a été confirmée ensuite par Nikov (70), Tomov (102) et Abadjieff (1).

Récemment, nous soulignions l'intérêt de la recherche de la flavatoxine (ou aflatoxine), ainsi que des conidiospores de moisissures productrices dans des denrées alimentaires variées (13). Des produits apparemment sains, exempts de mycélium et même de spores, disparues à la suite de traitements physiques (chaleur, lessivage par des solvants) ou chimiques, peuvent contenir des taux importants de cette flavatoxine qui constitue une menace pour le consommateur, surtout si l'on rappelle qu'en plus de son efficacité (12 fois plus *nocive* que la lasiocarpine d'*Heliotropum europeum* (Schoental) [90]) — qui n'a jamais été sérieusement démontrée chez l'homme — elle présente une résistance exceptionnelle tant aux traitements thermiques qu'aux agents chimiques. Inversement, la présence de moisissures à l'état de spores ou de mycélium envahissant n'est pas liée à la pollution par le toxique : la plupart des produits vivriers africains contiennent *A. flavus;* un petit nombre d'entre eux seulement renfermeront des taux décelables de toxine; cependant, ces spores représentent — surtout celles de souches toxinogènes — un danger différé, en puissance; danger inévitable, pourtant, puisque ces organites de résistance sont, non seulement présents dans des produits tropicaux, mais aussi dans des céréales et des légumes de Caen, dans l'air, l'eau et le sol des régions tempérées. Ces trois espèces pathogènes majeures sont, d'ailleurs, inégalement représentées (13).

Une part très grande de ce mémoire dans lequel nous publions nos faits personnels sera consacrée à la flavatoxine. Nous envisagerons, cependant, des caractères morphologiques et physiologiques plus généraux se rapportant aux espèces des groupes *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*.

Nous en situons ci-dessous les membres au sein de la classification proposée par Raper et Fennell (80) et montrons l'évolution comparée de la couleur de leurs conidiospores respectives (Diagramme 1).

Stérigmates unisériés	Têtes conidiennes en forme de massues	groupe *A. clavatus*	
	Têtes conidiennes en colonnes compactes	groupe *A. fumigatus*	— Cléistothèces absents. Série *A. fumigatus*. — Cléistothèces présents. Série *A. fischeri*.
Stérigmates bisériés et unisériés	Têtes conidiennes radiées portées par des conidiophores rugueux	groupe *A. flavus*	

La taille, la forme et l'ornementation des spores telles que nous les révèle le microscope électronique, même de pouvoir de résolution moyen, sont des critères déterminants de la diagnose des espèces (tabl. I), ainsi que nous l'avons montré précédemment (44).

UNIV. LEIDEN BIBL.

TABLEAU I

CLASSIFICATION ADOPTÉE POUR LES SPORES DES 3 GROUPES *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*

	GRANDE TAILLE (supérieure à 6 μ)	TAILLE MOYENNE DE 6 A 3,5 μ			PETITE TAILLE INFÉRIEURE A 3,5 μ	
Fortement épineuses (épines supérieures à 0,4 μ)						
Spinulées (épines de 0,2 à 0,4 μ)	*A. flavo-furcatis*				*A. fumigatus*	
Verruqueuses (ornements de 0,2 μ) . . .	*A. effusus* *A. oryzæ*	*A. parasiticus* *A. columnaris*	*A. flavus* *A. parasiticus* *A. effusus*			
Rugueuses			*A. zonatus*		*A. fischeri*	*A. fischeri*
Lisses				*A. clavatus*		
	Subovalaires ou ovalaires Rapport Longueur-largeur 1,1 à 1,4	Sphériques ou sub-globulaires L voisin 1 / l	Subovalaires à ovalaires	Elliptiques L = 1,5 / l	Subglobu-laires ou ovalaires	Elliptiques

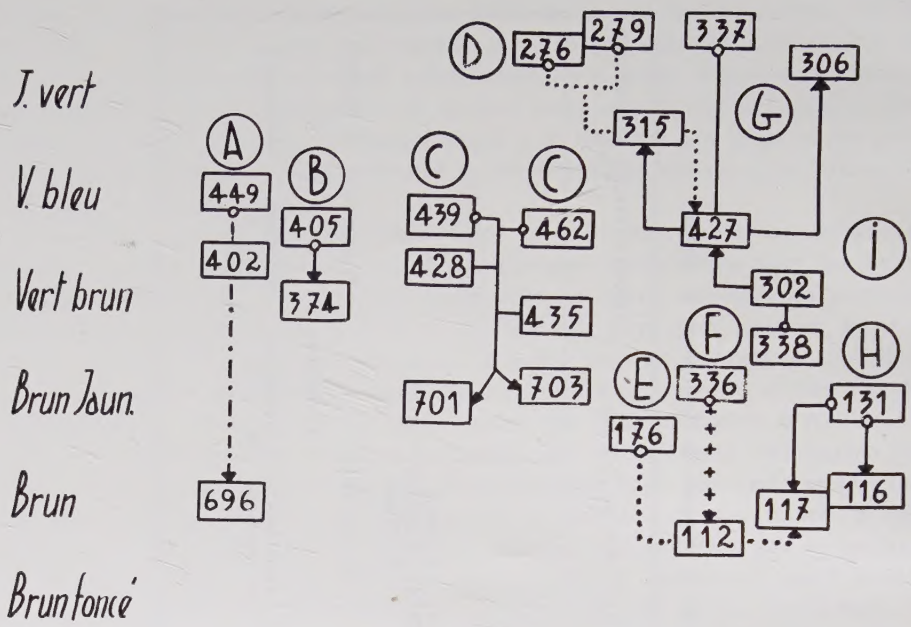


DIAGRAMME 1 — Évolution comparée de la couleur des spores chez les *Aspergillus* des groupes: *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*.

Chaque espèce est représentée en principe par 3 nombres de 3 chiffres inscrits dans un rectangle. Celui qui porte un petit cercle sur sa base désigne la couleur des spores entre le 3e et le 5e jour de culture; la pointe de la flèche signale le coloris des spores âgées de plus de 20 jours. Les nombres intermédiaires se rapportent aux couleurs transitoires.

(Indice des couleurs d'aprés le code Seguy (92)

A — *A. fumigatus*; B — *A. fischeri*; C — *A. clavatus*; D — *A. flavus*; E — *A. effusus*; F — *A. oryzae*; G — *A. parasiticus*; H — *A. flavo-furcatis*; I — *A. columnaris*.

II. — ÉTUDE MORPHOLOGIQUE

L'appareil sporifère de reproduction asexuée définit morphologiquement le mieux les moisissures du genre *Aspergillus*. Du point de vue fonctionnel et organique, les espèces chez lesquelles ont été décrits les cléistothèces (autrefois périthèces), tissu spécialisé dans la production d'ascospores, font partie de la classe des *Ascomycètes*. Les autres y sont apparentées par similitude.

Cependant, à côté de ces organes auxquels on attribue une fonction définie et, plus précisément, un rôle dans les phénomènes sexuels ou de multiplication végétative, le thalle des *Aspergillus* est sujet à des accidents structuraux et à des troubles morphologiques; nous décrirons trois de ceux-ci :

— Les sclérotes et filaments stériles d'*A. flavus*.

— Les corémies ou synnemas de la même espèce.

— Les chlamydospores d'*A. clavatus*.

Enfin, nous préciserons l'influence de certains facteurs sur la production de cleistothèces par A. *fischeri*.

A) I. — *Les sclérotes et filaments stériles d'*A. flavus

Les sclérotes (du grec σλερος : dur) résultent de l'association et de la soudure de filaments mycéliens non spécialisés, en masse compacte, glomérulaire, généralement colorée, de taille variable. De tels éléments ont été signalés occasionnellement dans des conditions mal définies chez certains groupes : *A. niger*, *A. tamarii*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, alors qu'inexplicablement ils n'ont jamais été rencontrés chez *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans* (85).

Pour *A. flavus*, spontanée ou provoquée, leur apparition a lieu au sein d'un feutrage d'hyphes rampants. D'abord blanches, ces masses deviennent grises, puis anthracite et finalement brun noir; leur surface est irrégulière et leur taille varie de 0,8 à 1,2 mm atteignant très rarement 2 millimètres.

Leur structure intime, après coupes histologiques et colorations diverses, a été définie précédemment (40). Rappelons que l'observation microscopique révèle une couche (30 à 40 μ) de « cellules » externes (4 à 10, le plus souvent 6 à 7 rangées) la plupart du temps irrégulières, à paroi fine, vidées de leur contenu, proches de la définition que donne F. Moreau (62) du synenchyme parenchymateux de protection. Elles affectent une disposition en puzzle : leur taille est comprise entre 5 et 8 μ. La zone médullaire, au contraire, est composée de filaments à section plus géométrique, vaguement hexagonale, de diamètre 6 à 8 μ, quelquefois orientés « en courant ». Le cytoplasme est dense et emplit totalement la lumière délimitée par une paroi épaisse. Cette partie centrale constitue un synenchyme collenchymateux de réserve.

Nous avons coloré électivement ces deux régions du sclérote par le lugol, le bleu de toluidine (solution à 1 p. 100 dans l'acide phénique à 1,5 p. 100 dans l'eau), le bleu coton acétique (solution de bleu coton C 4 B Poirrier à 0,5 % dans l'acide acétique à 3 % dans l'eau), le carmino-vert (mélange de Carmin « 40 » et de vert d'iode en solution dans un mélange d'alun de potasse et d'acide phénique dans l'eau), la coloration de Wirtz modifiée (action successive du vert malachite à 7,6 % et de la safranine à 0,25 % dans l'eau).

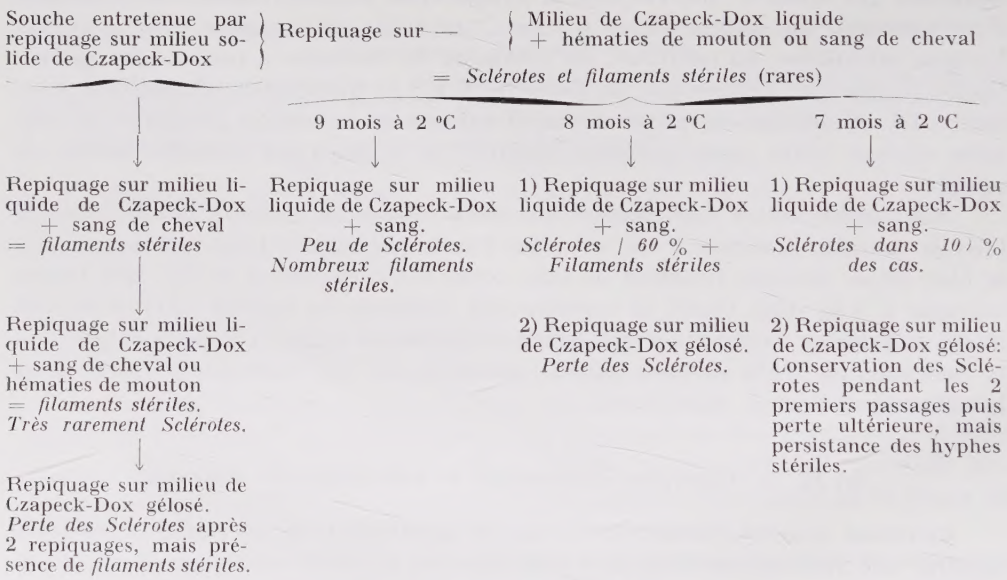
A) II. — *Apparition accidentelle et provoquée des sclérotes*

Certaines souches, isolées par nous, en particulier de cacahuètes, semblent montrer une aptitude particulière à engendrer ces accidents de l'appareil végétatif. Pour des clones apparemment non producteurs, il semble que le vieillissement (3 à 5 mois), la culture en atmosphère confinée pauvre en oxygène (haut des tubes à vis fermant hermétiquement), le passage sur milieux liquides additionnés de tensio-actifs (teepol) agissent comme facteur favorisant. Ces conditions stimulantes pour l'espèce type *A. flavus* sont sans effet sur les espèces voisines *A. parasiticus*, *A. zonatus*, *A. columnaris*, *A. oryzæ*, *A. effusus*, *A. flavo-furcatis*. Cependant, pour *A. flavus*,

le composant inducteur que nous avons trouvé déterminant est le sang : globules rouges de mouton (de 3 à 10 %) et surtout sang de cheval défibriné (de 2 à 13 %), additionnés au milieu liquide de Czapeck-Dox, incubé à 25 °C ou 30 °C. La gélose au sang type Institut Pasteur est inopérante : la pousse, quasi-inexistante, aberrante, rase, humide, y ressemble à celle d'une bactérie. Aux limites extrêmes des concentrations sanguines précisées ci-dessus, le nombre de sclérotes est assez faible; leur développement, bien que subissant toujours un temps de latence supérieur à celui des hyphes et des conidiophores, manifeste dans ce cas précis un retard assez considérable (7 à 9 jours). L'adjonction d'extrait alcoolique de chlorophylle, de liquide d'ascite est inefficace, de même que l'irradiation par les rayons X à des doses de 4 400, 5 500 et 7 000 r. A partir de 10 p. 100, le sérum sanguin et l'extrait globulaire montrent une efficience nette, beaucoup plus faible, cependant, que celle obtenue par addition du sang.

Une autre réponse est donnée par cette moisissure à la présence du sang : le développement de filaments stériles sans aucune particularité morphologique ou fonctionnelle, qui envahissent la culture, fréquemment après la maturation des spores et la recouvrent de touffes cotonneuses ou de réseaux diffus.

DIAGRAMME : 2



Le diagramme 2 indique la similitude de leur origine; il souligne la reversibilité du phénomène et démontre la difficulté de conservation des sclérotes sur milieux synthétiques.

A) III. — *Signification des sclérotes*

Certains auteurs les rapprochent des cléistothèces (108), par avortement de ces derniers; mais, une telle analogie entre ces deux organes n'a pu être confirmée.

Il s'agit vraisemblablement d'une tumorisation mycélienne; il y a effectivement, en un point précis du mycélium, des accolements, des distorsions, des enroulements anarchiques de filaments rampants, qui « mimen t » finalement un cléistothèce, mais sans en avoir la fonction essentielle. L'existence d'inducteurs, la plupart du temps hostiles à la moisissure à des doses élevées, s'exerçant plus naturellement sur des pousses vieillies ou dégénérées, la parenté qui les lie aux filaments stériles (désordre focalisé s'étendant sur l'ensemble de la culture) rappellent les dysfonctionnements provoqués des êtres supérieurs.

La lysine, dont nous avons montré, par ailleurs (40), qu'elle exerçait à partir de 1 p. 100, un rôle inhibiteur sur le développement d'*A. flavus*, jouerait, seule ou associée, même si elle n'est pas responsable du processus primaire profond, le rôle de déclencheur.

Ces phénomènes non élucidés, en particulier le rôle de substances telles que la thiamine et la pyrimidine déjà souligné par Nakata (69), Robbins et Kavanagh (84) à propos de *Sclerotinum rolfsii* qui recouvrent à l'heure actuelle des solutions tout à fait hypothétiques, permettront peut-être d'aborder d'autres problèmes plus vastes que nous nous réservons d'explorer ultérieurement.

B) *Les synnemas ou corémies d'*A. flavus

A deux reprises, à la surface de cultures âgées de 20 jours, déjà couvertes d'hyphes stériles gris pâle à beige sale est apparu spontanément un synnema branchu de 0,9 à 1,5 centimètre de long dont les rameaux se divisaient dès le lendemain et se couvraient à leur extrémité de conidiophores (fig. 1). Un autre synnema beaucoup plus diffus, issu du fond du tube, de couleur très blanche, sans conidiophore, couvert d'exsudat, rampera sur la tranche de gélose jusqu'à mi-hauteur. L'observation microscopique dévoile des hyphes de 2 types. Les uns, de gros diamètre (4 à 5 μ parfois 6,5, certains, très épineux, atteignant 9 à 10 μ) à contenu cytoplasmique peu visible dont les parois portent des granules biréfringents, sont grossièrement parallèles, rendus solidaires par les aspérités de la couche externe. Ils sont colorés en rose violacé par le bleu de toluidine; ils se rétrécissent vers leur extrémité; leur lumière est obturée par de rares cloisons (une tous les 20 à 30 μ). Les autres sont d'un diamètre plus modeste (2,5 à 4 μ), aux parois lisses moins épaisses. Teintés en verdâtre par le même colorant, ils sont fragmentés par de nombreuses cloisons (fig. 2), situées entre deux renflements qui rappellent des chlamydospores avortées.

Les deux types d'hyphes sont intimement associés. Pourtant, la cohésion entre les deux systèmes de filaments n'est établie ni par anastomose latérale, ni par gélification des membranes, ni par secrétion de substances agglutinantes. L'armature, constituée des gros filaments orientés parallèlement, est consolidée par un lacis irré-

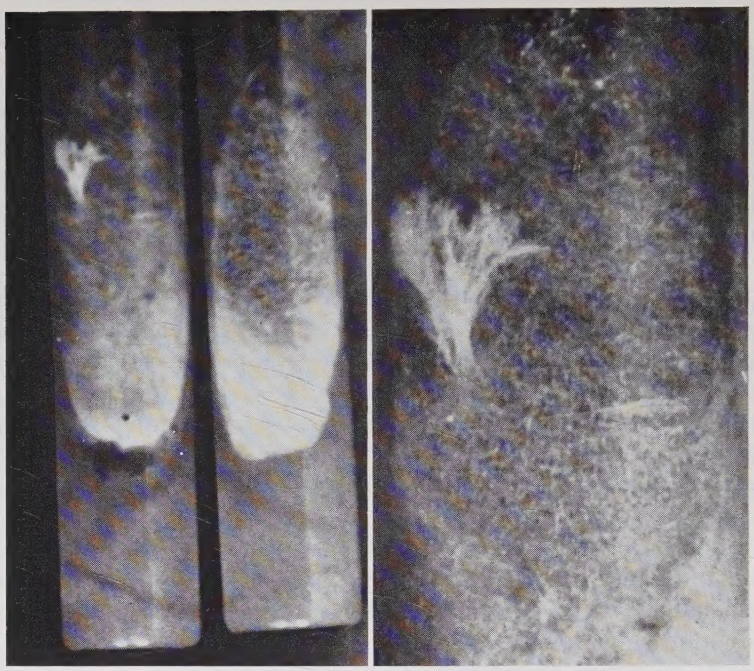


FIG. 1 (*à gauche*). — Cultures d'*A. flavus* montrant la présence abondante de filaments stériles, et dans un tube le développement d'un synnema (G. × 1 env.).
(*à droite*). Synnema branchu grossi (G. × 2,5 env.).

gulier de tubes mycéliens de petit diamètre qui se croisent à tous les niveaux (voir fig. 2). Les conidiophores, assez rares, sont facilement reconnaissables : colorés en violet foncé, ils sont emplis d'un cytoplasme dense; certains se trouvent au centre de l'agrégat. Comme pour l'induction des sclérotes, un facteur semble jouer un rôle prédominant dans la genèse des structures corémiformes : il s'agit de la diminution

TABLEAU II

COMPARAISON DES STRUCTURES CORÉMIFORMES D'*A. flavus* ET D'*A. clavato-flavus*

	A. flavus	*A. clavato-flavus*
Structure	Filaments stériles + conidiophores avec quelques têtes à maturité	Conidiophores associés (5 ou 6)
Longueur	9 à 15 mm	Souvent supérieure à 2 mm
Diamètre	Très important supérieur à 1,5 mm	60 à 100 μ
Repiquage	Anomalie. Reproduction très irrégulière sinon impossible au cours des repiquages	Structure reproductible par repiquage. Partie intégrante du patrimoine génétique

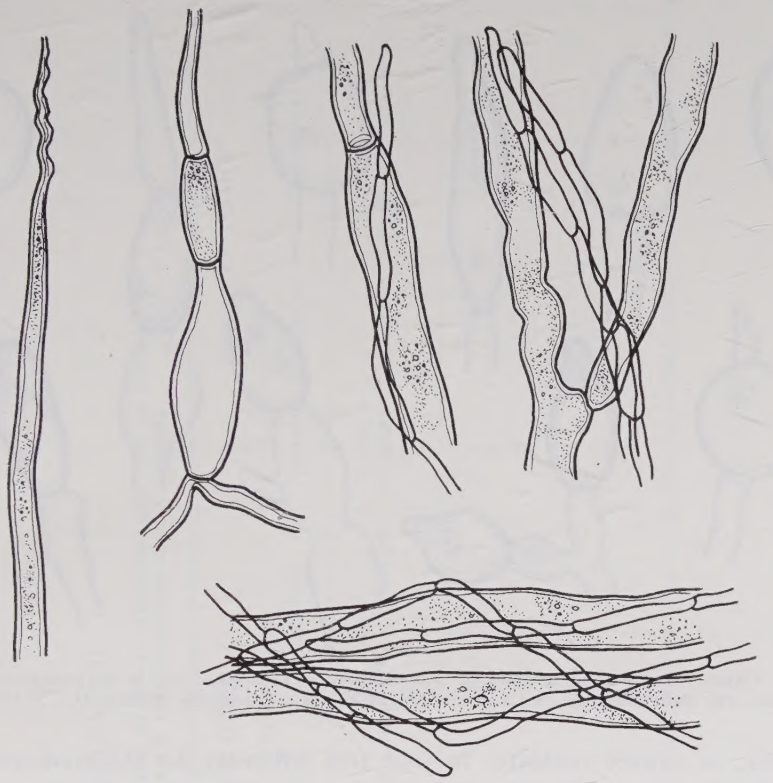


FIG. 2. — Filaments du synnema d'*A. flavus* : les tubes mycéliens de gros diamètre constituent l'armature consolidée par des hyphes plus grêles (G. × 1 000 env.).

de la ventilation obtenue par l'obturation hermétique des tubes (bouchon à vis métallique ou en bakélite) engendrant une augmentation importante du taux d'humidité interne et de gaz carbonique, ainsi qu'une raréfaction de la teneur en oxygène.

C) *Les chlamydospores d'*A. clavatus

Décrites en détail, il y a quelques années par nous-même (8), nous les avons retrouvées dans les milieux liquides contenant de fortes quantités de thiabendazole (1 mg/ml) où le mycélium est grenu, réduit à des aspects en grains de tapioca, difficiles à dissocier, à des filaments aux terminaisons lovées et rabougries, présentant un épaississement au niveau de certains articles renflés en bambous (9). Ces « pseudochlamydospores » sont caractérisées par des bombements oblongs ou pyriformes sans épaississement de la paroi, sans condensation cytoplasmique. Dans ces conditions, l'appareil végétatif de certaines souches est restreint; il est converti en un thalle levuriforme de 3 à 5 « cellules ». Ces articles hypertrophiés, sans aucune fonction de résistance ou de dispersion, naissent aussi sur le thalle d'*A. parasiticus* et

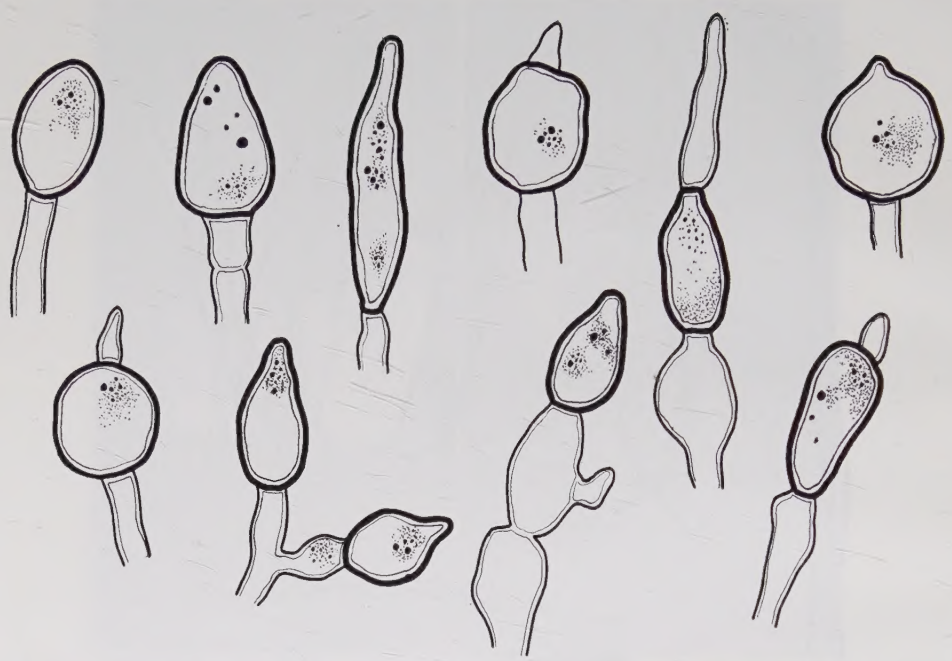


FIG. 3. — Chlamydospores terminales et intercalaires développées sur le mycélium d'*A. zonatus* par culture sur milieu liquide de Czapeck-Dox et lait (1 : 4) en tube roulant (G. × 1 000 env.).

d'*A. flavus*, en culture roulante. Ils sont très différents des chlamydospores vraies d'*A. zonatus* (fig. 3) obtenues dans les mêmes conditions.

Quoi qu'il en soit, ces aberrations des appareils végétatifs et sporifères, obéissent à des facteurs stimulants dont nous nous proposons de préciser, plus tard, l'exacte incidence.

D) *Les cléistothèces d'*A. fischeri

Très voisine d'*A. fumigatus* (les appareils conidiens sont superposables) cette espèce en diffère, cependant, par la forme et l'ornementation des spores (44) et surtout par la présence parmi les hyphes de cléistothèces, crème à jaunâtres, qui, lorsqu'ils sont abondants, transforment des plages ou la surface entière de la colonie en croûte crayeuse.

Sur cette espèce, ensemencée sur deux séries de milieux variés, respectivement incubés à 20 °C et 37 °C, nous avons noté la date d'apparition des premières spores et des premiers cleistothèces, ainsi que la densité relative de chacune de ces formations (tabl. III).

La température d'incubation modifie considérablement l'aspect de la culture : à 20 °C, dans la plupart des cas, elle est de couleur blanc sale à crème, plus ou moins sèche; à 37 °C, elle ressemble à s'y méprendre à celle d'*A. fumigatus*.

La source de carbone organique exercerait un effet favorisant sur tel ou tel type

TABLEAU III

INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION D'APPAREILS CONIDIENS ET DE CLEISTOTHÈCES PAR *A. fischeri*

MILIEU DE CULTURE	INCUBATION A 20 °C				INCUBATION A 37 °C			
	Appareils conidiens		Cleistothèces		Appareils conidiens		Cleistothèces	
	jour d'apparition	importance	jour d'apparition	importance	jour d'apparition	importance	jour d'apparition	importance
Czapek-Dox gélosé	4	+	10	+++	1	+++	2	±
Malt	5	±	5	++++	2	++++	7	+
Sabouraud	4	+++	5	++++	2	++++	—	—
Wort Difco	5	++	10	+++	7	++	12	+
Pomme de terre, carotte	3	+	4	++++	2	++	—	—
Gélose nutritive	10	±	—	—	2	++	—	—
Gélose au sang	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum coagulé	4	++	12	+++	2	+	—	—
Lœwenstein	7	+++	12	++++	4	++		

de reproduction (végétative par conidiospores ou sexuée par ascospores). A côté de sucres exaltant la formation de cléistothèces, (il s'agit, en général, de grosses molécules en chaînes, en fait, des polyosides), il existe des glucides qui facilitent la naissance des appareils conidiens comme on le verra ci-dessous :

1. — *Glucides favorisant la formation des cléistothèces :* glucose, maltose, tréhalose, amidon de pomme de terre, amidon de riz, glycogène, cellulose, esculine.

2. — *Glucides favorisant la formation d'appareils conidiens :* rhamnose, galactose, dextrine, glycérol.

3. — *Glucides favorisant le développement d'hyphes stériles :* arabinose.

Exposés à la lumière ultra-violette de longueur d'onde 3650 Å, les cléistothèces obtenus sur cellulose, isolés sur un mycélium très discret, presque invisible à l'œil, émettent par fluorescence primaire une couleur jaune soufre à jaune verdâtre très caractéristique.

La différenciation spécifique n'est donc qu'un problème de limite : à partir de quelle frontière deux caractères sont-ils assez dissemblables pour qu'on puisse les attribuer à deux espèces?

Dans le cas précis d'*A. fischeri*, la température d'incubation seule, à cause des désordres morphologiques qu'elle engendre, peut orienter le diagnostic vers *A. fumigatus*. D'autre part, Tran van Ky et coll. (104) ont souligné qu'il existait des communautés antigéniques très nettes entre ces deux variétés révélées par les immunoglobulines γ G et γ M des sérums de lapins hyperimmunisés avec *A. fumigatus* ou de malades atteints d'aspergillose pulmonaire.

A. fischeri ne serait-il qu'une forme mésophile et saprophyte d'*A. fumigatus*, espèce thermophile et pathogène? La rareté de la première espèce laisserait à penser qu'elle représente un mutant non pathogène d'une espèce largement représentée dans la nature.

III. – ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE

La détermination spécifique de la plupart des moisissures, et des *Aspergillus*, en particulier, est essentiellement d'ordre morphologique. Les seuls critères utilisés par les systématiciens sont : la couleur, la taille des colonies sur milieu de Czapeck-Dox et sur milieu au malt, la présence de cléistothèces, dont l'apparition est, nous l'avons dit, soumise à de nombreux facteurs. Cette observation à l'œil nu des caractères macroscopiques est suivie par une description microscopique détaillée de l'appareil conidien.

Il nous a paru nécessaire d'envisager cette étude dans un cadre plus vaste d'investigations correspondant à quatre types de critères nouveaux :

1. — Description des cultures sur milieux variés et appréciation de certaines réactions biochimiques simples semblables à celles utilisées pour les bactéries.
2. Utilisation des glucides et formation de pigments.
3. — Taille, forme, ornementation des spores par observation au microscope électronique.

4. — Mise en évidence, et surtout, titrage de certaines enzymes, et métabolites.

Nous laisserons de côté les trois premiers points exposés dans des publications antérieures (40, 41, 44).

Nous préciserons les techniques employées et les résultats obtenus, tant dans la recherche des métabolites divers comme l'acide kojique et la flavatoxine, que dans le titrage de certaines enzymes, du groupe des hydrolases. Il s'agit du développement d'une note préliminaire (12) forcément condensée.

A. — PRODUCTION D'ACIDE KOJIQUE

Isolé pour la première fois par Saito (87) et Yabuta (110, 111) à partir d'un filtrat de culture d'*A. oryzæ*, l'acide kojique s'est révélé, dès sa découverte, doué de propriétés inhibitrices, notamment vis-à-vis des bactéries Gram-négatives. Depuis le début du siècle, la liste des micro-organismes producteurs s'est allongée, s'étendant même à certaines bactéries (77). Cependant, le genre *Aspergillus* montre, parmi l'ensemble des moisissures, une réelle aptitude à la synthèse de cet « acide » organique. Nous nous sommes efforcé de simplifier les méthodes de mise en évidence et de titrage de ce corps, pour qu'elles soient directement applicables au diagnostic de groupes et d'espèces et entrent, ainsi, dans ce système de critères biochimiques associés aux caractères morphologiques et microscopiques habituellement utilisés. Le révélateur de l'acide kojique est le chlorure ferrique; son usage sera amplement généralisé dans les méthodes exposées ci-après.

α) *Techniques de mise en évidence et de titrage*

1. — Détection des souches productrices par culture sur milieu solide.

Composition et préparation du milieu.

— Solution minérale de Czapeck-Dox, sans sucre, gélosée à 17 ‰	1 000 ml	
— Glucose	25 g	à ajouter après le premier chauffage.
— Maltose	5 g	
— Peptone	2 g	

Après mélange des ingrédients, répartir en tubes de 16 millimètres de diamètre à raison de 7 millilitres par tube. Boucher au coton. Stériliser 10 minutes à l'autoclave à 115 °C.

Au moment de l'emploi, ajouter au milieu fondu 0,35 ml d'une solution à 1 p. 100 de chlorure ferrique dans l'acide chlorhydrique 0,1 N. Incliner les tubes, de façon à obtenir une tranche et un culot de gélose.

Ensemencement et lecture.

Réalisé en stries à l'anse de platine à partir d'une suspension dense de spores sur toute la surface de la gélose, exception faite du culot qui sert de témoin, l'ensemencement est pratiqué de la même manière sur le milieu solide de Czapeck-Dox.

L'incubation, accomplie à 28 °C, est contrôlée chaque jour par une lecture : la présence d'acide kojique se traduit par un virage au brun roux de la masse profonde de la gélose, en particulier, au contact des hyphes pénétrants incrustés.

Les souches du groupe *flavus* donnent une réaction nette, le troisième ou quatrième jour, maximale, du sixième au huitième jour. Les résultats sont douteux pour les espèces sécrétant moins de 0,05 p. 1 000 d'acide kojique.

2. — Titrage de l'acide kojique brut dans les filtrats de cultures

La culture stationnaire, préconisée par Arnstein et Bentley (4) dans les flacons d'Erlenmeyer de 500 millilitres, est remplacée par la pousse dans un petit volume de ce même milieu nutritif liquide, réparti en tubes de 16 millimètres de diamètre, à raison de 5 millilitres par tube, et soumis à l'agitation lente et rotative (voir p. 207) à 25-28 °C.

A partir du deuxième jour après l'ensemencement, un examen à la touche est pratiqué, par prélèvement d'une bouclée de liquide à l'anse de nichrome, déposée à la surface de papier Watman n° 3 préparé comme indiqué ci-dessous.

Des feuilles de papier Watman n° 3, format 12 × 12 centimètres, sont immergées dans une cuvette contenant 10 millilitres de chlorure ferrique cristallisé à 1 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 0,1 N. Égouttés, puis séchés à l'étuve à 30 °C, ces feuillets sont découpés en languettes de 5 millimètres de largeur prêtes à l'emploi. Le papier ainsi préparé doit être maintenu à l'abri de la lumière et de l'air. La durée de conservation ne doit pas excéder un mois.

La présence de traces d'acide kojique, que l'on révèle dès le deuxième jour pour certaines espèces, se manifeste par un rosissement du dépôt.

1° *Titrage par diffusion.*

Vingt millilitres d'eau gélosée à 17 p. 1000 d'agar Difco sont additionnés, après fonte du milieu, de 1 millilitre de solution de chlorure ferrique cristallisé à 2 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 0,1 N, puis, coulés en boîtes de Pétri de verre, de diamètre 9,5 cm. Des cavités de 10 millimètres de diamètre sont découpées à l'emporte-pièce et emplies de 0,2 ml de filtrat de culture. Des dilutions d'acide kojique à 0,3, 0,1, 0,05, 0,03, 0,01, 0,005 p. 100 servent de témoin. Après une heure de diffusion à la température du laboratoire, le titrage se fait par comparaison du diamètre et de l'intensité de l'auréole brun-rouge obtenue avec le filtrat à titrer, ou l'une de ses dilutions, d'une part, et des halos entourant les cavités de titre connu, d'autre part.

On apprécie avec précision les concentrations en acide kojique allant de 5 à 0,05 p. 1000. C'est, en somme, l'extension à différentes recherches de la méthode de diffusion en gélose employée par Jacquet et M^me^ Steeg (46) pour les antibiotiques et par Richou et coll. (83) pour les enzymes. Dans tous les cas d'utilisation de cette technique au cours de ce mémoire, les cavités auront un diamètre de 10 mm, et chaque fois que nous y parlerons de diffusion, c'est à ce procédé que nous ferons allusion.

2° *Extraction - Chromatographie - Titrage colorimétrique.*

Pour les espèces qui ne synthétisent que des traces d'acide kojique ou pour celles à partir desquelles on veut obtenir ce métabolite à l'état purifié, il y a lieu de pratiquer une extraction et éliminer par chromatographie les composants capables d'interférer.

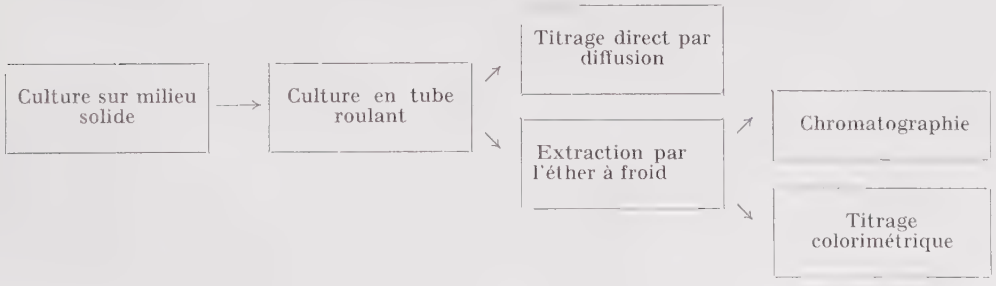
a) *Extraction* — Les tubes roulants de 16 millimètres, incubés pendant 8 jours, sont stérilisés à 120 °C pendant 15 minutes, puis recouverts par 15 millilitres d'éther éthylique. Ils sont agités au « flask shaker » BTL pendant 2 heures. Quatre lessivages à l'éther sont nécessaires. Après 30 minutes d'agitation, la première fraction éthérée représente 60 à 70 p. 100 de l'acide kojique total contenu dans le milieu de culture. Dans les mêmes conditions l'usage du chloroforme, recommandé par Parrish et coll. (72), ne permet d'extraire que 20 à 30 p. 100 de ce même composé. Les quatre fractions éthérées sont recueillies à travers un filtre fin sur fiole de Kitasato, puis évaporées sous vide à 40 °C.

b) *Chromatographie* — Le résidu est repris par 1 millilitre de chloroforme, puis, chromatographié sur couche minee en flacon de Borel, sous l'action ascendante du système de solvant benzène : acide acétique : methanol (3 : 1 : 1), selon la méthode exposée pour la recherche de flavatoxine (43). Après une migration du front du solvant de 35 millimètres, la plaque est séchée; une solution de chlorure ferrique cristallisé est vaporisée révélant un spot rouge vineux de Rf 0,65 correspondant à l'acide kojique pur (Parrish et coll.)(72).

c) *Colorimétrie* — Le résidu obtenu au temps 2-a est resolubilisé dans 10 millilitres d'eau distillée à 60 °C, puis filtré sur membrane Millipore (pour élimination des substances insolubles et obtention d'un filtrat parfaitement limpide). Le déroulement du titrage colorimétrique est ensuite conforme au processus décrit par Arnstein et Bentley (4, 5, 7). Le colorimètre Elvi, avec un filtre de 520 mμ, nous a permis de détecter, par référence à une courbe étalon, des quantités d'acide kojique de $1.\ 10^{-3}$ mg/ml soit 0,001 g/l.

Nous préconisons le schéma d'analyse suivant :

Schéma : Processus de recherche et de titrage de l'acide kojique



Les résultats obtenus pour toutes les souches d'*Aspergillus* des groupes *flavus*, *fumigatus* et *clavatus* sont rassemblés dans le tableau XVIII.

TABLEAU IV

INFLUENCE DE LA NATURE DES GLUCIDES ET DES SELS DE SODIUM SUR LA PRODUCTION D'ACIDE KOJIQUE PAR 6 ESPÈCES D'*Aspergillus*

	A. flavus TOXINOGÈNE		*A. parasiticus* TOXINOGÈNE				*A. columnaris*			*A. oryzæ*				*A. flavofurcatis*			*A. clavatus*
Nombre de jours .	15	30	7	10	17	22	9	14	22	7	10	16	25	10	16	25	20
Arabinose																	
Rhamnose																	
Xylose																	
Glucose																	
Galactose.																	
Mannose																	
Fructose																	
Saccharose																	
Maltose																	
Cellobiose																	
Tréhalose.																	
Lactose																	
Raffinose																	
Amidon soluble . .																	
Amidon de p. de t. .																	
Glycogène																	
Inuline																	
Cellulose																	
Glycérol																	
Mannitol																	
Sorbitol																	
Dulcitol																	
Inositol																	
Citrate																	
Tartrate																	
Pyruvate																	
Hippurate																	

β) *Conditions générales de production de l'acide kojique*
Influence des sucres

Si la synthèse d'acide kojique est variable dans le temps, avec un maximum atteint vers le 10e jour, elle est sujette à de nombreux facteurs, en particulier, à la nature de la source de carbone. Nous avons étudié cette influence pour quelques espèces sécrétrices. La présence du métabolite est testée par la méthode de diffusion en gélose. Dans le tableau IV, le signe + + + désigne un taux d'acide kojique supérieur à 1 p. 100, + + de 0,2 à 1 p. 100, + inférieur à 0,2 p. 100, ± indique la synthèse de traces décelables par cette méthode.

Parmi les sucres et produits apparentés, certains comme le glucose, le xylose, le fructose, le maltose, le raffinose, le glycogène et le sorbitol manifestent à un très haut degré un pouvoir inducteur sur la synthèse de l'acide kojique; d'autres, au contraire, ne semblent pas intervenir dans cette secrétion (cellulose, inuline, lactose) (voir tabl. IV).

γ) *Importance de l'acide kojique - Propriétés antibiotiques*

D'une acidité prononcée — il déplace l'acide carbonique de ses sels — l'hydroxyméthyl-2, hydroxy-5, pyrone 1-4, ou acide kojique fit reparler de lui, il y a quelques années, lorsque Buu Hoi et Ratsimamanga (16) examinant des infusions de thé moisies auxquelles la croyance populaire attribuait sous le nom de Hongo, dans le sud de la France et dans toute l'Espagne, des vertus thérapeutiques quasi-miraculeuses reconnurent une moisissure du groupe *flavus oryzæ* fortement secrétrice de ce métabolite.

Remplaçant l'espèce vulgairement appelée « champignon japonais », par une souche toxinogène (en l'occurrence un *Aspergillus flavus*, isolé d'aliments du bétail à Madagascar), nous avons recherché la présence simultanée de cet acide organique et de la toxine dans cette boisson. Le milieu de culture est constitué par de l'eau du robinet additionnée de sucre et de 2 p. 100 de thé du commerce.

TABLEAU V

Production d'acide kojique et de flavatoxine sur le thé

Durée de l'infusion	N°	Quantité de saccharose (%)	pH au bout de 20 jours	Acide kojique	Flavatoxine	Auréole (en mm)
2 min	I	5	4,3	100 mg/l	+	0/46
2 min	II	10	4	500 mg/l	+	0/48
10 min	III	5	4,1	700 mg/l	+ + + } 4 mg/l	28/44
10 min	IV	10	4,1	500 mg/l	+ + + }	25/48

Dans la dernière colonne de droite la propriété antibiotique du filtrat est testée par la méthode de diffusion en gélose ensemencée avec *Staphylococcus aureus*. Le premier chiffre indique en millimètres une auréole d'inhibition totale, le deuxième une zone de moindre pousse.

Se développant très bien sur ces milieux, où le mycélium forme un tapis épais (surtout en III et IV), recouvert dès le 6e jour par une sporulation intense, la moisissure a montré une capacité réelle de synthèse de ces deux corps. L'extrait éthéré de thé, pratiqué à l'appareil de Soxhlet, et ajouté à un milieu inerte non excitateur de la toxinogenèse comme celui de Czapeck-Dox, provoque, à des taux largement décelables, l'excrétion du poison. Les propriétés antibiotiques des filtrats, de III et IV surtout, peuvent ne pas être attribuées à la seule présence de l'acide kojique, mais, au rôle éventuel d'autres substances agissant en synergie (acide aspergillique, par exemple).

La relation étroite existant entre acide kojique et flavatoxine pour les espèces du groupe *flavus* sera envisagée au chapitre de la toxinogenèse.

Doué de propriétés antibactériennes évidentes, quoique insuffisantes pour qu'il trouve un emploi en thérapeutique, l'acide kojique possède, par ailleurs, une action létale sur les leucocytes humains, les spirogyres, la souris (30 à 40 mg par voie sous-cutanée; 80 mg par os), le lapin, le rat, le chien (1 g/kg par voie intraveineuse).

En milieu liquide, les solutions d'acide kojique bloquent le développement bactérien à des concentrations supérieures à 1 p. 1000. En milieu solide la solution à 1 p. 100 (pH 5,2) a une activité nulle. Par la méthode de diffusion en gélose, le spectre d'action antagoniste a été comparé à celui de l'acide citrique, autre composé qui, en dehors de son origine « naturelle » (jus de citron ou de pamplemousse), peut être purifié à partir de cultures d'*A. clavatus* et surtout d'*A. niger* (77). Au pH de 4,4, ce dernier acide est dépourvu de pouvoir bactériostatique.

TABLEAU VI

Spectre d'activité antibactérienne de l'acide kojique et de l'acide citrique en solution dans l'eau

	Acide kojique a 1 %	Acide citrique a 0,1 %	Acide citrique a 1 %	Acide citrique a 10 %
pH du liquide	4,4	3,6	2,3	1,7
Staphylococcus aureus	30	0	23	23
Bacillus cereus	32	0	25	41
Escherichia coli	28	0	19	37
Klebsiella pneumoniæ	33,5	0	0	32
Salmonella typhi	28,5	20	32	44
Salmonella para A	34,5	0	27	44
Salmonella para B	27,5	0	22	36
Proteus vulgaris	27	0	24	38
Proteus mirabilis	24	0	22	39

Les chiffres de chacune des quatre colonnes indiquent le diamètre d'inhibition totale exprimée en millimètres. L'acide nitrique ajusté aux pH de 2,3 et 4,4 est privé de propriétés inhibitrices.

B. — *PRODUCTION DE QUELQUES ENZYMES : TITRAGE D'ENZYMES BRUTES DANS LES FILTRATS DE CULTURE DES* ASPERGILLUS

1. Hydrolases

La culture directe des *Aspergillus* sur quelques milieux appropriés nous renseigne, en première approximation, sur la diversité de la mosaïque enzymatique de ces moisissures. Le titrage des enzymes, les plus communément rencontrées, par une méthode simple s'impose, dès qu'on veut les mieux connaître, et peut devenir un élément de diagnose.

Méthode. — La méthode est celle de la diffusion en gélose après dilution successive des filtrats obtenus par cultures non agitées dites stationnaires, sur quatre milieux différents issus de la formule de Czapeck-Dox. D'après Specht (94), en effet, le développement en surface des moisissures donnerait de meilleurs résultats, du point de vue de la qualité enzymatique, que les cultures profondes. Pour des raisons de commodité, nous nous sommes arrêté à une culture de 5 jours à 21 °C.

Technique de titrage. — Le milieu de base est constitué par de l'eau gélosée à 17 p. 1000. Ce milieu est réparti à raison de 20 millilitres en tubes de verre bouchés hermétiquement puis stérilisé à l'autoclave. Liquéfié au bain-marie bouillant, on lui ajoute, au moment de l'emploi, soit :

1° 1 ml d'une solution stérile d'amidon soluble à 3,5 p. 100 dans l'eau;

2° 1 ml d'une solution stérile d'amidon de pomme de terre Merck à 3 p. 100 dans l'eau;

3° 1 ml de lait écrémé tyndallisé;

4° 1 ml d'une solution stérile de gélatine à 10 p. 100 dans l'eau;

5° 0,8 ml d'huile d'olive du commerce (ou 0,5 ml de tributyrine) et 0,8 ml de sulfate de bleu de Nil à 1 p. 1000 dans l'eau distillée.

Chaque mélange est coulé en boîtes de Pétri de 90 millimètres de diamètre, puis refroidi. On pratique, alors, dans la masse de la gélose, 9 cavités équidistantes les unes des autres. 0,15 ml de chacune des dilutions du filtrat obtenu par passage sur filtre Durieux 101 sont alors déposés dans les cavités.

Il est parfois difficile, lorsqu'on utilise les lipides, d'obtenir, sans l'adjonction de tensio-actif un substrat homogène. La technique suivante nous a donné entière satisfaction : le mélange 5 est agité au « flask shaker » BTL pendant 3 minutes, puis, coulé dans des boîtes de Pétri ayant séjourné 30 minutes au freezer; la prise en masse de l'émulsion très fine est presque instantanée. Les boîtes préparées, l'incubation a lieu à 30 °C sauf, pour la boîte 5, mise à 37 °C pendant 18 heures. La lecture est directe pour les boîtes 3 et 5; elle utilise un révélateur pour les boîtes 1, 2 et 4.

a) *Amylases :* La surface de la gélose est recouverte de 3 millilitres d'une solution de lugol au 1/2. La masse du milieu se colore en brun roux pour l'amidon soluble

TABLEAU V

Origine	Normandie				Valois				Gateau Anglais			
Milieu	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	
pH terminal	5,0	4,1	3,7	8,8	4,3	3,8	7,0	7,8	5,1	4,1	7,3	8
Poids mycélium	161	191	619	434	120	137	711	482	220	123	980	4
Amidon soluble	+ 1	+ 1	20	100	5	20	50	500	+ 1	+ 1	10	
Amidon de pomme de terre	+ 1	3	30	500	10	20	300	3 000	3	+ 1	20	1
Gélatine	3	+ 1	5	500	5	5	300	500	+ 1	+ 1	300	1
Lait	3	3	10	100	20	10	300	500	2	3	50	1
Huile d'olive	— 1	— 1	— 1	— 1	+ 3	+ 1	5	7	— 1	— 1	— 1	—

TABLEAU V

Souche	*A. fumigatus* E 1940							
Température	21 °C				37 °C			
Milieu	1	2	3	4	1	2	3	
pH terminal	5,9	6,1	5,5	5,8	5,3	5,5	6,1	7,
Poids mycélium	100	70	542	718	365	320	563	6
Amidon soluble	— 1	— 1	5	10	— 1	1	750	1
Amidon de pomme de terre	— 1	1	10	100	1	5	1 000	3
Gélatine	1	1	10	30	1	3	200	3
Lait	— 1	— 1	10	30	— 1	3	100	2
Huile d'olive	— 1	— 1	1	3	— 1	1	1	

TABLEAU V

Souche	*A. flavus* Madagascar AK (*) + F (*) +							
Température	21 °C				30 °C			
Milieu	1	2	3	4	1	2	3	
pH terminal	5,5	5,9	5,9	6,2	6,3	4,7	6,0	6
Poids mycélium	71	144	657	581	401	420	426	5
Amidon soluble	30	3	10	50	3	2	50	
Amidon de pomme de terre	10	1	300	100	3	2	50	5
Gélatine	10	10	300	100	1	1	10	3
Lait	10	10	300	100	1	3	50	1
Huile d'olive	— 1	—1	3	10	+ 1	— 1	5	

(*) AK : acide kojique; F : flavatoxine.

ergillus clavatus 21 °C

Kew				A.T.C.C.				Fristole				Air			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
4	4,9	7,2	8,4	5,2	4,9	3,6	7,1	5,8	4,8	4,0	7,6	5,0	6,9	7,7	7,8
3	133	798	312	10	10	230	398	21	41	396	345	33	32	62	89
1	+ 1	300	500	+ 1	+ 1	50	500	+ 1	2	50	500	5	5	1 000	1 000
5	5	500	5 000	+ 1	3	50	300	2	5	50	800	5	5	1 000	5 000
0	10	600	600	2	2	10	300	+ 1	+ 1	50	300	+ 1	+ 1	10	30
0	10	400	500	2	+ 1	10	10	+ 1	+ 1	50	500	7	+ 1	30	20
1	— 1	5	10	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	+ 1	— 1	— 1	+ 1	+ 2

ergillus fumigatus — *A. fischeri*

A. fumigatus 1 240 007								*A. fischeri*							
21 °C				37 °C				21 °C				37 °C			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
)	6,8	6,2	5,3	4,6	5,1	5,2	6,9	5,2	5,2	7,8	8,1	6,4	7,2	7,9	8,3
	104	135	399	621	590	716	759	538	163	90	73	72	20	81	85
	- 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	100	3	— 1	— 1	— 1	— 1	+ 1	— 1	5
:	— 1	— 1	— 1	1	± 1	— 1	500	5	1	— 1	— 1	2	1	1	10
	— 1	4	4	— 1	± 1	— 1	100	20	5	— 1	— 1	10	5	50	50
	— 1	5	5	± 1	— 1	— 1	100	30	10	± 1	± 1	5	3	30	20
:	— 1	— 1	1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	+ 1	+ 1	— 1	— 1	1	+ 1

ie A. flavus — Toxinogène

A. flavus Fort Lamy AK + F+								*A. flavus* entomophage AK+ F+							
21 °C				30 °C				21 °C				30 °C			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
5	7,3	8,7	9,1	5,1	6,9	8,5	9,2	5,5	7,4	8,4	8,7	5,2	6,8	8,7	8,7
	27	93	9,1	74	49	82	68	106	59	83	75	59	68	63	67
	1	30	5	1	1	10	50	1	1	10	30	1	1	10	30
	1	30	10	3	1	1	10	3	1	30	50	3	3	10	30
	3	300	100	3	1	100	50	10	10	100	300	30	5	30	50
	5	500	300	3	1	50	10	10	10	300	1 000	30	10	30	300
1	— 1	3	5	— 1	— 1	3	5	1	— 1	3	3	— 1	1	3	5

TABLEA

Souche	Sarrigua AK+ F—							
Température	21 °C				30 °C			
Milieu	1	2	3	4	1	2	3	4
pH terminal	6,1	6,6	7,8	8,1	6,4	6,1	8,4	8,
Poids mycélium	66	71	61	74	63	73	60	
Amidon soluble	3	1	100	500	10	1	50	10
Amidon de pomme de terre	5	3	100	3 000	30	5	100	30
Gélatine	10	50	500	500	50	100	500	10
Lait	10	50	500	300	50	50	100	10
Huile d'olive	— 1	— 1	+ 1	+ 3	— 1	— 1	— 1	—

TABLEA

Souche	*A. parasiticus* AK+ F++							
Température	21 °C				30 °C			
Milieu	1	2	3	4	1	2	3	4
pH terminal	5,9	6,0	5,0	7,0	7,3	6,6	6,7	6,
Poids mycélium	123	104	784	612	376	703	729	7
Amidon soluble	1	1	5	5	30	3	1	
Amidon de pomme de terre	1	1	5	10	30	5	3	
Gélatine	3	3	300	100	70	50	100	5
Lait	3	3	100	300	50	30	100	3
Huile d'olive	— 1	— 1	5	2	1	± 1	5	

TABLEA

Souche	*A. effusus* AK+ F—							
Température	21 °C				30 °C			
Milieu	1	2	3	4	1	2	3	4
pH terminal	5,4	5,2	6,8	7,2	6,5	5,5	8,2	8
Poids mycélium	215	267	560	650	508	558	603	
Amidon soluble	5	10	1 000	5 000	500	50	1 000	
Amidon de pomme de terre	5	10	1 000	2 000	500	50	5 000	1
Gélatine	50	100	1 000	1 000	100	50	1 000	
Lait	30	50	5 000	5 000	100	100	3 000	1
Huile d'olive	± 1	1	3	5	± 1	3	5	

A. flavus Belleville AK+ F—								*A. flavus* D AK— F—							
21 °C				30 °C				21 °C				30 °C			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2	6,5	7,3	7,7	7,2	6,7	8,0	8,4	6,8	6,7	6,2	5,1	7,2	6,5	7,7	7,7
8	28	145	135	10	51	94	107	239	200	764	643	451	603	655	625
1	1	1 000	300	30	1	50	30	— 1	— 1	5	3	10	1	300	50
1	1	500	500	50	1	100	100	± 1	± 1	10	5	30	3	100	100
0	10	1 000	500	10	50	500	300	— 1	— 1	5	10	1	1	100	50
0	10	1 000	500	30	30	500	300	— 1	— 1	5	3	1	1	100	50
1	— 1	5	5	1	— 1	5	5	— 1	— 1	— 1	3	— 1	— 1	— 1	3

A. flavus columnaris AK+ F—								*A. zonatus* AK+ F—							
21 °C				30 °C				21 °C				30 °C			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
5	7,0	7,2	6,7	7,2	7,0	7,3	6,7	6,6	7,2	7,1	6,9	6,4	7,0	6,2	6,9
4	42	79	780	131	64	79	107	31	45	93	602	24	23	118	580
5	50	500	10000	100	10	100	3 000	— 1	— 1	10	10	— 1	— 1	5	30
0	1 000	5 000	1 000	500	50	500	4 000	— 1	— 1	10	30	— 1	— 1	10	30
0	10	50	3 000	30	30	10	800	— 1	— 1	— 1	1	— 1	— 1	— 1	± 1
0	10	50	3 000	40	30	30	1 000	— 1	— 1	— 1	1	— 1	— 1	— 1	± 1
1	— 1	5	7	± 1	— 1	5	10	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1	— 1

A. oryzæ Corée AK+ F—								*A. flavo furcatis* AK+ F—							
21 °C				30 °C				21 °C				30 °C			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
8	5,8	5,1	6,5	5,4	5,3	5,3	6,5	5,8	6,1	5,9	6,2	4,8	4,6	5,6	6,5
7	250	536	876	288	431	798	784	190	175	923	898	425	440	932	777
1	1	300	100	3	1	10	1 000	1	1	30	10	5	5	50	100
1	3	1 000	100	5	1	50	5 000	2	2	50	50	10	10	200	100
2	1	10	500	10	10	100	1 000	100	50	500	500	100	100	1 000	1 000
5	3	30	1 000	30	10	100	500	50	50	1 000	50	100	100	500	500
1	3	— 1	3	+ 1	± 1	3	5	1	— 1	1	3	1	3	5	1

formé surtout d'amylopectine [1], en bleu de prusse pour l'amidon de pomme de terre [2] (amylose + amylopectine). La présence d'une amylase se manifeste en 1 par une auréole incolore, en 2 par un double halo incolore et rose. Cette double auréole traduit l'activité de 2 systèmes enzymatiques : l'α amylase ou dextrinogène amylase et la β amylase ou saccharogène amylase, cette dernière dégradant les dextrines jusqu'au stade maltose. Ces amylases hydrolysent aussi le glycogène, ce qui explique l'important développement des *Aspergillus* à fort pouvoir amylolytique sur ce sucre.

FIG. 4. — Titrage de la caséinase par la méthode de diffusion en gélose. L'hydrolyse se manifeste par des auréoles transparentes autour des cavités qui reçoivent des dilutions croissantes du filtrat à étudier.

b) *Caséinase :* La caséolyse est révélée par une zone transparente autour de la cavité ou, pour certaines espèces, par une zone de précipitation qui double la zone d'éclaircissement (fig. 4).

c) *Gélatinase :* L'hydrolyse de la gélatine est rendue visible par l'emploi d'un révélateur au chlorure mercurique qui précipite en blanc laiteux la gélatine, laissant incolores et transparents les endroits où celle-ci a été hydrolysée.

d) *Lipase :* La lipolyse se traduit par une auréole bleue, induite par la formation d'acides gras qui font virer l'indicateur de pH. La gélose est tamponnée, au départ, à la valeur de 7,5 par le mélange :

- Phosphate monopotassique : 0,70 g
- Phosphate disodique : 8,30 g.

Pour chacune de ces quatre enzymes, il est défini une unité : c'est la concentration

minimale qui sous un volume de 0,15 ml provoque l'apparition nette d'une auréole de lyse d'un diamètre de 12 millimètres. Le nombre d'unités enzymatiques d'un filtrat sera représenté par la plus grande dilution active sur un substrat donné. Ces techniques, d'une remarquable sensibilité, nous ont permis d'apprécier 100 000 à 300 000 U dans la salive prélevée 3 heures après l'ingestion du déjeuner, 5 000 000 U/g dans la gélatinase du N.B.C. Cleveland, et 500 000 000 U/g dans l'amylase N.B.C. Cleveland.

Nos résultats sont représentés dans le tableau VII (*a* à *f*). Les lectures sont faites à partir de cultures sur les quatre milieux suivants : de gauche à droite Czapeck-Dox [1], Czapeck-Dox enrichi à 2 p. 100 de glycérol [2], Czapeck-Dox additionné de 1 p. 100 de peptone [3] ou de 1 p. 100 d'extrait de levure [4]. Les filtrats qui en proviennent sont dilués convenablement.

Les caractéristiques des adjuvants organiques sont :

	Azote aminé	Azote total	Rapport $\frac{\text{azote aminé}}{\text{azote total}}$
Peptone à 1 %	0,364 g/l	0,868 g/l	0,42
Extrait de levure à 1 %.	0,488 g/l	0,616 g/l	0,72

D'après les caractères enzymatiques bruts, nous pouvons adopter la classification suivante des trois groupes retenus :

TABLEAU VIII

Classification des espèces d'après leur activité enzymatique

Activité	Amylolytique	Protéolytique	Lipolytique
Très forte . . .	*A. clavatus* *A. effusus* *A. columnaris* *A. oryzæ*	*A. effusus* *A. oryzæ* *A. flavus* *A. columnaris* *A. flavo-furcatis*	*A. flavus* *A. oryzæ*
Forte	*A. flavus* 30 °C *A. parasiticus* *A. fumigatus* 37 °C *A. flavo furcatis*	*A. fumigatus* 37 °C *A. clavatus* *A. parasiticus*	*A. parasiticus* *A. columnaris*
Moyenne	*A. flavus* 20 °C *A. parasiticus*	*A. fischeri* 20 °C	*A. clavatus* *A. oryzæ*
Faible	*A. fumigatus* 20 °C *A. zonatus* 20 et 30 °C *A. fischeri*	*A. fischeri* 37 °C	*A. fumigatus* 37 °C
Nulle	*A. fumigatus* 20 °C	*A. zonatus*	*A. zonatus* *A. fumigatus* 20 °C

2. *Catalase*

Recherche de l'activité catalasique des aspergillus. — Le réactif employé est constitué par le mélange extemporané des deux solutions, volume à volume : eau oxygénée à 30 volumes, Triton X 100 (Touzart et Matignon) à 2 p. 100 dans l'eau.

Une culture sur milieu de Czapeck-Dox gélosé, vieille de 10 à 15 jours, est recouverte par 3 millilitres du mélange; couché pendant quelques secondes pour permettre le contact intime, sous l'action du mouillant, entre le réactif et les hyphes et appareils sporifères, le tube est ensuite redressé. La présence de catalase est révélée par une mousse intense qui, au bout de quelques minutes, gagne tout le contenu du tube; l'absence totale de bulles caractérise une souche catalase négative.

Tous les *Aspergillus*, y compris ceux appartenant aux autres groupes définis par Raper et Fennell, sont catalase positive (12).

C. — *RECHERCHE ET TITRAGE DE LA FLAVATOXINE*

En moins de 10 ans, la flavatoxine, agent cancérigène 1 000 à 1 500 fois plus puissant que le jaune de beurre, additif chimique maintenant interdit en alimentation humaine, a suscité des programmes de recherche considérables. Leur nombre, et leur diversité atteste, si besoin en est, de l'attention persistante avec laquelle les laboratoires du monde entier se penchent sur ce sujet d'une actualité brûlante. Ce problème dépasse maintenant largement le cadre de la recherche théorique, puisqu'il touche en premier chef le consommateur. Les méthodes d'extraction et de dosages physico-chimiques proposées dès 1962 par le Tropical Product Institute et reprises depuis, après quelques modifications, par de nombreux laboratoires, utilisent deux des propriétés majeures de ces composants toxiques : d'une part, leur grande solubilité dans certains solvants organiques comme le chloroforme, l'acétone, le méthanol et le benzène — alors qu'elles sont totalement insolubles dans les solvants habituels des lipides (éther sulfurique, éther de pétrole, hexane); d'autre part, leur fluorescence, qui varie suivant les types du bleu vert au bleu violet, excitée par la lumière ultra-violette de longueur d'onde 3 650 Å. Nous nous sommes attaché à mettre au point des méthodes d'analyse faciles, rapides, dans la mesure du possible miniaturisées — et fournissant bien sûr des résultats reproductibles — afin qu'elles soient réalisables par tous ceux qui sont chargés du contrôle des produits alimentaires.

L'exposé de nos techniques a fait l'objet d'une publication (43) à laquelle nous renvoyons le lecteur. Quelques observations sont à faire, cependant, de légères modifications ayant été apportées au processus initial.

Titrage. a) *Extraction.* — Après l'adjonction d'eau au taux de 10 millilitres pour 20 grammes d'échantillon préconisée par Lee (53), nous avons remplacé le solvant primitif au chloroforme par le mélange chloroforme : acétone (98 : 2), ce deuxième composant favorisant grâce à son hydrophilie une meilleure pénétration du système dans le produit à contrôler. L'addition de 3 grammes de sable de Fontainebleau facilite la dispersion et empêche la formation de nodules au sein des poudres et broyats.

b) *Purification.* — Après extraction continue à froid pendant 40 minutes dans l'agitateur BTL, le mélange est filtré rapidement (filtre Buchner, papier Watman n° 1), puis la fraction chloroformique est évaporée sous vide. Le résidu est repris

par 20 millilitres de méthanol et 20 millilitres d'hexane (qui remplace l'éther de pétrole primitivement utilisé) qui sont transvasés dans une ampoule à décanter. Après addition d'un millilitre d'eau distillée, la phase inférieure alcoolique est soutirée et subit un nouveau lavage à l'hexane avant d'être définitivement recueillie dans un flacon d'Erlenmeyer, qui reçoit 25 millilitres d'eau distillée. Le mélange eau-alcool est transvasé dans une ampoule à décanter. Cette fraction aqueuse est lavée après agitation, 3 fois avec 20 millilitres de chloroforme. Les extraits chloroformiques sont réunis, après passage sur un filtre contenant 5 grammes de sulfate de sodium anhydre, dans une fiole de Kitasato; puis, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu repris par le chloroforme (5 ou 10 ml) est utilisé pour la chromatographie en couche mince.

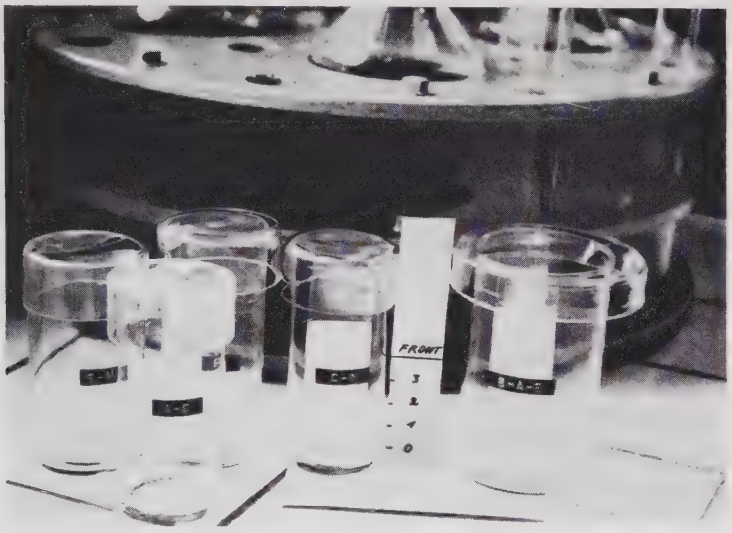


FIG. 5. — Au premier plan : cuves pour la chromatographie renfermant les lames recouvertes de gel de silice en couche mince.
Au second plan : le plateau modifié de l'appareil pour culture tournante, pouvant porter les tubes de 22 × 200 mm et les flacons de 500 ml.

c) *Chromatographie.* — Certains composés fluorescents contenus dans les produits naturels — la scopolétine par exemple ou d'autres substances renfermées dans les carottes pourries, comme la 6-methoxy-mélleine peuvent interférer sur les chromatogrammes avec les flavatoxines. Des purifications, longues et onéreuses, par passage sur colonnes de silice, d'alumine ou de terre d'infusoire ont été proposées par les biochimistes.

L'emploi simultané de plusieurs systèmes de solvants appliqués à notre technique de chromatographie en couche mince sur lame de microscope (43) nous permet de limiter considérablement le risque d'erreur et d'éliminer de l'interprétation des chromatogrammes ces « fantômes » de toxines, parasites (fig. 5). La rapidité de préparation des plaques et leur prix de revient très modeste nous autorisent à conduire

TABLEAU IX

ESSAIS DE SYSTÈMES DE SOLVANT SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ELAVATOXINES

N°	CUVE	SYSTÈME DE SOLVANT	MIGRATION	VALEURS DES Rf				
				Flava-toxine B	Flava-toxine G	Autres taches fluorescentes		
1	Flacon de Borel	Éther éthylique (100) (68)	Très faible	0,20	0,15			
2	Flacon de Borel	Chloroforme : méthanol [a] (95 : 5)	Séparation excellente et rapide	0,62	0,52	0,40-	0,25-	0,18-
3	Flacon de Borel	Chloroforme : acétone [b] (90 : 10) (25)	Bonne séparation	0,55	0,45		0,18	0,16
4	2 phases : Becher 100 ml et couvercle flacon de Borel	Benzène : alcool eau (46 : 35 : 19) (26)	Très bonne séparation	0,53	0,50		0,30	0,25
5	Flacon de Borel	Méthanol : eau (60 : 40)	Rapide, peu spécifique	0,65				
6	Flacon de Borel	Chloroforme : acide acétique (90 : 10) (17)	Séparation moyenne	0,60	0,44		0,84	
7	Flacon de Borel	Éther : chloroforme : acide acétique (40 : 40 : 20) (54)	Mauvaise séparation phénomènes de bords marqués	0,54	0,24			

conjointement quatre chromatographies, utilisant les quatre premiers systèmes de solvants mentionnés dans le tableau IX.

Lorsque le degré d'humidité de l'air est élevé (de 50 à 60 %), des incidents se produisent; la toxine, en particulier, est repérée au-delà de sa position habituelle. Il est donc nécessaire d'opérer — comme avec des techniques plus complexes — dans un local à atmosphère sèche. L'ensemble des opérations d'extractions, de dégraissage et de chromatographie doivent se dérouler, si possible, à l'abri de la lumière vive. Les solutions étalon chloroformique de flavatoxine sont conservées à + 4 °C dans des flacons rodés, enfermés eux-mêmes dans des récipients hermétiques, recevant des tampons de coton imbibés de chloroforme.

Certaines techniques utilisent le mélange [a] 97 : 3 (67) ou [b] 85 : 15 (24). Les solvants sont testés avec un extrait chloroformique de culture d'*A. parasiticus* sur lait *homogenéisé* stérilisé. La quantité minimale de toxine du type B décelable par cette méthode est 0,00065 µg.

Si une tache fluorescente de couleur bleue à bleue violette a la même position que la flavatoxine témoin sur trois des quatre chromatogrammes utilisant des systèmes de solvants différents, elle aura le même Rf sur le quatrième et pourra être identifiée avec certitude à la flavatoxine.

C'est tout naturellement vers les cacahuètes, et les dérivés de l'arachide (huiles, tourteaux, aliments composés) que, dès l'origine, s'est orientée notre enquête, qui porte sur 400 échantillons environ (13). Elle s'est bien vite étendue à d'autres produits vivriers d'origine tropicale, puis à diverses denrées alimentaires consommées dans nos régions, lait et produits laitiers en particulier, ainsi qu'à des substances issues de cultures de moisissures (enzymes).

Le pourcentage des cacahuètes avariées est très faible : il ne constitue que 4 p. 100 des fruits entiers ou décortiqués. Ces arachides du commerce, tant celles d'Afrique, que celles vendues sur le marché français, peuvent être considérées comme très peu dangereuses pour le consommateur. Les contrôles effectués sur les huiles du commerce et de maison de régime (huile de première pression) prouvent, comme l'ont montré Hiscocks et coll. (35), Chong et coll. (19), Parker et coll. (71) que la flavatoxine, insoluble dans les carbures saturés servant à l'extraction des lipides, reste liée à la fraction protéique incluse dans les tourteaux. Ces derniers représentent, d'ailleurs, qu'ils soient bruts ou associés à d'autres constituants (aliments composés pour animaux), un des produits les plus remarquablement souillés par ce toxique, alors que d'autres substances voisines, issues de coton, de lin, de soja, de tournesol, de coprah, se révèlent exemptes de flavatoxine. En France, nous avons contrôlé de très près des lots de carottes en sachets plastiques souillées par la « pourriture molle » à *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Stemphylium*, *Botrytis*. L'un des échantillons recouvert par *A. flavus* contenait jusqu'à quatre parties par million de toxine. Enfin, les laits de mélange et les fromages analysés étaient dépourvus du dérivé toxique de type M, que Purchase (*), en Afrique du Sud, a mis en évidence sur des laits individuels

(*) Purchase (I.) et Vorster (L.) *S.A. Med. J.*, 1968, **42**, 219. Cette « Milk-toxin » (Lactoflavatoxine) ou hydroxy-aflatoxine B, est retrouvée, non seulement, dans le lait, mais aussi, dans l'urine et les fécès des animaux recevant des rations toxiques. Il reste à préciser si ce dérivé est

provenant de vaches, nourries à l'étable, avec des fanes et de la farine d'arachides dont certains de ceux-ci étaient vraisemblablement très toxiques.

Souches. *Existence de souches toxinogènes et atoxinogènes d'*A. flavus.

L'omniprésence et le cosmopolitisme de cette espèce — que nous avons même reconnue sur les substrats les plus divers tels que cacahuètes, carottes, pain, fruits, café vert, légumes, lait en poudre, terre, air — ont été signalés par de nombreux chercheurs : Forgacs (29), Lafont et Frayssinet (49), Lafont et Lafont (50), Christensen (20), Moreau (60), van der Waltt (106), de Scott (91), Thatcher (96), Senser (93), Agnihotri (2), Rai (79), Charpin (18), Kal'vish (47), Proctor et Parker (78), Krogh (48).

Cependant, la présence de spores d'*A. flavus*, accompagnées ou non de celles d'autres moisissures, n'implique pas forcément — et cela pour deux raisons — la pollution de ces matériaux par la flavatoxine. D'abord, parce que la germination des spores, suivie de la toxinogenèse, obéit à certaines exigences de température et d'humidité et que la dernière propriété est soumise à l'action de constituants inducteurs que nous avons évoqués dans un article précédent (11) et que nous reprendrons brièvement ici; ensuite, parce que certaines spores ne donneront jamais naissance, même si les conditions optimales de croissance et de synthèse sont réunies, à un mycélium secréteur de toxine.

1. — Conditions de cultures et de toxinogenèse

a) *pour* A. flavus

La température optimale de croissance de la plupart des *A. flavus* et *A. parasiticus* se situe de 25 à 37 °C; la secrétion de toxine est maximale entre 25 et 30 °C. L'importance de l'humidité a été mise en évidence par culture sur poudre de lait (humidité de départ : 6,1 %). Placées en atmosphère saturée en eau (98 %), les spores s'hypertrophient mais ne donnent jamais naissance à un mycélium sécréteur, même après 25 et 35 jours d'expérience. D'une façon générale, sur la plupart des milieux naturels, l'humidité minimale inductrice de toxinogenèse nous est apparue de l'ordre de 30 p. 100.

Bon nombre de glucides, lorsqu'ils sont ajoutés à un substrat minéral inerte, sont totalement inefficaces : c'est le cas de l'arabinose, du galactose, du maniose, du fructose, du lactose, du saccharose, des dextrines. Sont, au contraire, inducteurs : l'amidon soluble, l'amidon de riz, l'amidon de pomme de terre, le cellobiose, le tréhalose, le glycérol. Les lipides, s'ils favorisent fortement le développement des appareils sporifère et végétatif (acides palmitique, arachidique, laurique, myristique, béhénique, lignocérique) n'ont aucun effet sur la toxinogenèse. Certains d'entre eux ralentissent et même inhibent la croissance du champignon (A. caproïque, propionique, caprylique). Parmi les acides aminés, les meilleurs résultats ont été enregistrés avec la proline, la phénylalanine, l'acide glutamique, le tryptophane, l'asparagine, la valine, l'histidine et la méthionine.

originellement présent dans les aliments contaminés par *A. flavus*, et s'il est préférentiellement excrété par les organismes vivants; ou s'il représente la flavatoxine B convertie par métabolisme.

La toxinogenèse naturelle sera donc liée à la nature du substrat. De grandes variations ont été enregistrées lorsque ces moisissures se développent sur des céréales variées (11) humidifiées (culture en fiole de Roux sur graines diverses à 20 % dans l'eau).

TABLEAU X

PRODUCTION DE FLAVATOXINE PAR *A. flavus* APRÈS CULTURE DE 7 JOURS SUR SUBSTRATS VARIÉS
(La quantité de flavatoxine est rapportée en mg pour 1 kg de substrat)

Alpiste	6	Colza	7,5	Millet	55	Niger	10
Avoine	2	Fèves	traces	Moha	3,5	Sarrasin . . .	2,5
Gruau avoine .	75	Haricots . . .	2,5	Navette . . .	25	Riz.	75 à 200
Blé	50	Lentilles . . .	1	Œillette . . .	2	Soja	25
Chenevis . . .	5	Maïs.	15	Orge	7,5	Tournesol . . .	5

b) *pour* A. clavatus

La toxicité de cette espèce, bien qu'assez remarquablement irrégulière, a été expérimentée sur des animaux de laboratoire (souris, rat, lapins). Nous avons pu, en 1961, en suivre l'effet nocif sur un troupeau de bovidés, ingérant du blé germé en herbagère sur lequel avait proliféré *A. clavatus*. La substance toxique provoque, surtout, des lésions d'ordre biochimique sans support anatomique perceptible; cependant les souris montraient une nette destruction des hématies (numération globulaire moyenne de 8 600 000 mm³ s'étalant en fait de 7 410 000 à 10 250 000, alors que les souris saines de même race avaient une moyenne érythrocytaire de 10 900 000 et des extrêmes de 8 700 000 et 13 900 000). Cette activité hémolytique a été retrouvée *in vitro* sur globules rouges de mouton, et cette propriété est bien en rapport avec l'anémie constatée sur les souris. L'amidon, ce polyoside qui joue un rôle très actif dans la toxinogenèse d'*A. flavus*, s'est révélé un très bon adjuvant pour la sécrétion de clavatoxine.

***

A côté des souches toxinogènes, à des titres divers, d'ailleurs, il existe et parfois même, elles voisinent, des souches non toxinogènes. Il devenait alors urgent de les distinguer et de titrer leur pouvoir toxique. Pour lever l'ambiguïté, nous avons donné le nom de souches ou races à des isolements d'une espèce donnée réalisés en des lieux divers à partir de produits variés; les clones seraient la descendance présumée d'un même individu par multiplication végétative.

Nous avons, d'abord, pensé, suivant une technique empruntée aux auteurs anglo-saxons (38) à cultiver la moisissure en boîte de Pétri sur un substrat gélosé enrichi de lait : cet aliment est, en effet, un précieux stimulant de la toxinogenèse (11). Les boîtes, après quelques jours de culture, sont placées sous la lumière ultra-violette : une lueur bleu verdâtre autour des hyphes souligne la présence de toxine. Malheureusement, l'opacité du milieu gêne considérablement la lecture et de nombreux autres corps risquent d'interférer. L'épreuve des microcultures sur lame de silicogel, précédant une chromatographie ascendante, n'ayant donné aucun résultat tangible,

nous nous sommes arrêté à un processus expérimental exploitant les avantages du tube roulant.

2. — Appareillage

Il s'agit de l'appareil pour culture de tissu F. Imbert (*) que nous avons, d'abord, utilisé tel quel — les récipients étant, alors, des tubes de verre 16 × 170 millimètres munis dans leur partie supérieure à 2 centimètres du bord d'un petit réservoir de 5 × 10 millimètres; puis que nous avons modifié en vue de l'obtention de plus grandes quantités de toxines, en remplaçant les plateaux d'origine par des surfaces en contreplaqué qui peuvent recevoir à la fois 12 tubes de 22 × 200 millimètres et 4 flacons de pyrex de 500 millilitres (voir fig. 5). Peu encombrant, l'ensemble peut être facilement mis à l'étuve et permettre l'expérimentation à des températures variables.

3. — Milieu de culture

Après des essais, concernant à la fois la vitesse d'apparition et le taux de toxine sécrétée (voir tabl. XI), nous avons opté pour le milieu suivant :

— Lait homogénéisé 800 millilitres

— Milieu de Czapeck-Dox 200 millilitres

Les volumes distribués étant respectivement de 5 millilitres pour les tubes 16 × 170 millimètres, 10 millilitres pour les tubes 22 × 200 millimètres, 30 millilitres pour les flacons de 500 millilitres.

4. — Culture

Les tubes ou flacons sont ensemencés à l'aide d'une suspension dense de spores (50 millions par ml environ) (nombre de gouttes au 1/20 ml = nombre de ml du milieu de culture), puis déposés dans l'appareil décrit ci-dessus, ils sont soumis à une rotation lente à 26 °C (6 tours environ à l'heure). Vingt-quatre heures après l'ensemencement, apparaît déjà sur la paroi interne des tubes, un mycélium transparent qui, en s'épaississant, au cours du vieillissement, prendra l'aspect d'un doigt de gant, lisse, dense, épais (1/5 à 1/2 mm), blanc jaunâtre, caoutchouteux, très difficilement dissociable, mais que l'on peut, sans le déchirer, sortir facilement du tube. Au cours de la croissance, le lait est digéré, et pour la plupart des souches, il est réduit, dès le 3e ou 4e jour, en un liquide hyalin jaune paille à jaune d'or. Les conidiophores sont rares; à maturité, ils ne sont visibles que dans la partie terminale de la culture. Après 8 jours, les surfaces couvertes par le mycélium sont les suivantes :

Diamètre intérieur	Hauteur	Surface
14 mm	115 mm	52 cm²
20 mm	160 mm	100 cm²
80 mm	120 mm	300 cm²

Au microscope, ce véritable plectenchyme se présente comme un réseau dense de filaments, dont de nombreux articles sont hypertrophiés (10 à 20 μ de diamètre 22 à 30 μ de long), certains portant des pseudochlamydospores : cellules mar-

(*) 85, faubourg Saint-Martin, 75-Paris.

TABLEAU XI

INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU SUR LA PRODUCTION DE FLAVATOXINE

COMPOSITION	DÉVELOPPEMENT MYCÉLIEN	APPARITION DE TOXINE (en jour)	IMPORTANCE DE LA TOXINE LE JOUR DE L'APPARITION	IMPORTANCE DE LA TOXINE LE 5e JOUR
Lait homogénéisé	Mycélium épais créé dès le 3e jour	4e	B+ G±	B+ G± Acide kojique-
Lait homogénéisé à 80 % dans Czapeck Dox	Mycélium épais jaune paille dès le 3e jour	3e	B+ G+	B+++ G+++ Acide kojique ±
Lait homogénéisé à 60 dans Czapeck Dox	Développement important jaunissant le 4e jour	3e	B± G±	B++ G+ Acide kojique +
Lait homogénéisé à 40 % dans Czapeck Dox	Mycélium s'épaississant le 4e jour	4e	B± G±	B++ G+ Acide kojique +
Lait homogénéisé à 20 % dans Czapeck Dox	Mycélium transparent peu épais	5e	B± G—	B± G+ Acide kojique ±
Czapeck Dox	Mycélium irrégulier peu adhérent	-	.	Acide kojique +

ginales ou terminales de 20 à 25 μ de diamètre sans forte condensation cytoplasmique (absence, en particulier, d'importantes réserves lipidiques révélables par le Soudan III) et sans épaississement de paroi (fig. 6). Deux hypothèses peuvent être formulées au sujet de l'apparition de ces cellules vésiculeuses. Elles pourraient jouer un rôle actif dans la synthèse de la flavatoxine — mais aucune vérification expérimentale n'étaye cette assertion — et, à ce titre, présenteraient une affinité réelle avec les ampoules qui conduisent la fermentation chez les mucorales (63). Les mêmes « cellules » apparaîtraient quand le thalle est placé dans des situations anormales

Fig. 6. — Culture d'*A. parasiticus* sur milieu liquide de Czapeck-Dox et lait (1 : 4) en tube roulant. Coloration Soudan III (G. × 1 000 env.).

(fig. 7) à la limite des conditions létales : dans ce cas précis, ce serait la flavatoxine qui agirait comme agent nocif. De nombreuses formes de souffrance ont été induites par ce produit toxique, en particulier chez les bactéries (21, 55, 109). L'addition de ce poison au milieu de Czapeck-Dox, même à des doses faibles (8 μg/ml), provoque chez *A. flavus* et *A. parasiticus*, à un degré moindre il est vrai que dans les tubes roulants contenant le milieu de Czapeck-Dox et lait (1 : 4), l'apparition de ces cellules enflées. Élément de diagnose important, nous n'avons pas observé d'aleuriospores analogues à celles décrites par Pore et Larsch (76) chez les espèces des groupes *terreus* et *flavipes*.

En revanche, des conidiophores atypiques, courts et atrophiés naissent ça et là... Pour une souche donnée, le poids de mycélium mesuré dans les mêmes conditions est assez constant (tabl. XII).

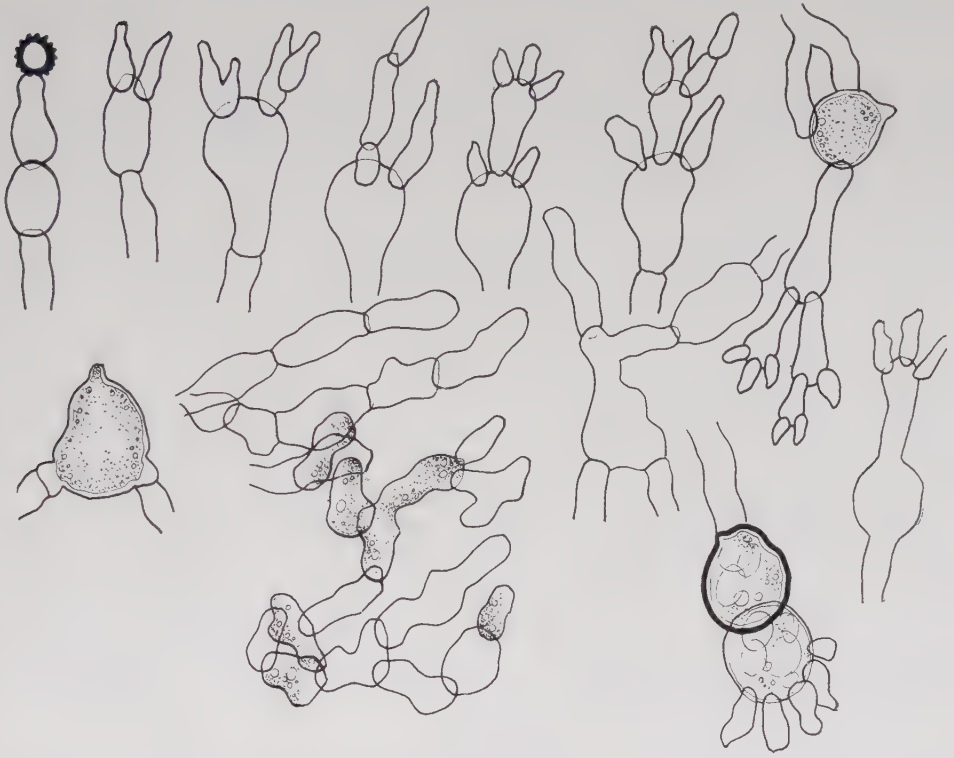


FIG. 7. — Culture d'*A. parasiticus* sur milieu liquide de Czapeck-Dox additionné de flavatoxine. Aberrations des appareils végétatif et sporifère (G. × 1 000 env.)

TABLEAU XII

POIDS DU MYCÉLIUM SEC OBTENU PAR CULTURE EN TUBE ROULANT SUR MILIEU LIQUIDE CZAPECK-DOX : LAIT (1 = 4)

SOUCHE	TUBE DE 16 MM (poids en mg)	TUBE DE 22 MM (poids en mg)	NOMBRE DE JOURS NÉCESSAIRES A LA DIGESTION TOTALE DU LAIT
A. parasiticus ATCC	260 220 218	504	5
A. flavus Madagascar	323 343 333	556	4
A. flavus Fort Lamy	222 221 224	595	3
A. flavus Batista	162 190 170	350	6
A. flavo furcatis	244 218	501	6
A. effusus	189 170	380	4
A. flavus Bangui	292		4
A. flavus	273		4
A. flavus O.N.C.A.	271		4
A. flavus Nouilles Corée	343 369		4
A. oryzæ Nouilles Corée	361 351		3
A. flavus carottes	321		4
A. flavus Alim. bétail	328		3
A. columnaris	230 219		3
A. zonatus	19		—

5. — Mise en évidence de la toxine

Chaque jour, à partir du 2e jusqu'au 8e, il est prélevé dans le réservoir du tube, à la micropipette, 5 et 10 µl de lait ou de liquide résiduel, qui sont ensuite déposés sur la lame de chromatographie à côté d'une goutte étalon positive. Puis, se déroule la technique précédemment exposée aboutissant à la lecture du chromatogramme sous ultra-violets. Tant que la digestion du lait n'est pas totale, un spot gris-bleu fluorescent persiste autour du point de dépôt de l'échantillon; spot que l'on peut atténuer en faisant précéder la chromatographie proprement dite par un lessivage à l'éther de pétrole, réalisé dans les mêmes conditions. La positivité de la tache indique une teneur minimale en flavatoxine de 0,08 partie par million. Nous avons examiné, par ce procédé, plusieurs centaines de souches. Sans tenir compte de leur appartenance systématique, nous pouvons, pour plus de commodité, les subdiviser en 3 groupes : les souches de collection (ATCC, CBS, Museum, privée); les isolements réalisés à partir de produits tropicaux, d'Afrique surtout, mais aussi d'Iran, d'Amérique centrale et du sud; les souches indigènes à Caen et à sa région.

De ces nombreux essais, des constatations fréquentes de similitude et de dissemblance entre les différents isolements nous ont amené à énoncer 2 postulats (à condition que l'on ait examiné au moins 10 souches isolées du même produit).

a) Si 50 p. 100 des clones isolés d'un même substrat ne produisent pas de flavatoxine, il y a de fortes chances pour que les 50 p. 100 restants soient atoxinogènes.

b) Si l'un d'entre eux synthétise la toxine, il est fort probable que les autres en sécrètent aussi à des taux variables.

L'hétérogénéité des populations dénoncée par le dernier postulat trouve une illustration très nette dans l'instabilité des espèces à faible pouvoir toxinogène. L'entretien des souches au laboratoire par repiquages successifs, en particulier, sur des milieux pauvres en substances organiques a pour effet d'amoindrir la sécrétion de toxine (aussi, l'étude du pouvoir toxinogène des souches a-t-elle été faite tout de suite après le premier isolement). Nous avons noté ce fait avec *A. flavus* Madagascar et *A. flavus* Fort-Lamy, ou après deux ans de transports successifs sur milieu de Czapeck-Dox, les dosages ne révèlent plus que le 1/10 des titres originels. Une autre observation abonde dans le sens de la précédente : la plupart des souches de collection qui connaissent justement ces repiquages successifs sont atoxinogènes. Les résultats exprimés par Parrish et coll. (72), relatifs aux *A. flavus* de la collection « NLCC », auxquels il est attribué un pouvoir toxique dans 25 p. 100 des cas, sont comparables aux nôtres, s'il s'agit de souches d'Amérique du Nord. Au contraire, cette proportion peu élevée, concernant des souches tropicales, trouve peut-être son explication (ni l'origine, ni le mode de conservation des souches ne sont précisés dans leur communication) dans le motif invoqué ci-dessus.

Seuls remèdes à cette « dévaluation du toxique » : la lyophilisation d'une part, la conservation à + 4 °C dans du sable de Fontainebleau stérile, d'autre part (44).

D'après leur propriété de produire éventuellement la toxine, les espèces du groupe *flavus* pourraient se subdiviser en :

Section toxinogène avec *A. flavus* et *A. parasiticus*, cette dernière ayant une

forte propension à sécréter les 2 types de toxines B et G. Peut-être, faudrait-il adjoindre à cette section *A. columnaris*, mais le nombre de souches testées de cette variation est insuffisant pour le confirmer ou l'infirmer.

— *Section atoxinogène* avec *A. zonatus* et les représentants des types *oryzæ* et *tamarii*. La plupart des souches utilisées dans l'industrie entrent dans cet ensemble et ont été éprouvées de très près sur ce point précis (64).

Notons que le pourcentage des souches toxinogènes de la section A est plus élevé dans les pays tropicaux que dans les régions tempérées (48 % contre 23 %), qu'il est faible pour les souches de collection (12 %) et que la proportion de souches sécrétant le mélange B et G ne représente que 7 à 8 % des formes toxinogènes.

Titrage des souches. *Titrage de toxine après culture en tubes roulants.*

Grâce à ce procédé miniaturisé, il nous a été permis de détecter le pouvoir toxinogène d'une souche, mais aussi de titrer avec précision cette faculté. Après 8 jours de culture, les tubes de 16 millimètres de diamètre sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement, le mycélium est décollé des parois, dilacéré grossièrement *in situ*, à l'aide d'un crochet métallique. Les tubes reçoivent alors 2 grammes de sable de Fontainebleau et 15 millilitres de chloroforme. Obturés hermétiquement à l'aide d'un bouchon de liège maintenu par du ruban autocollant, ils sont placés dans le « flask shaker » « BTL » où ils subissent une agitation constante et rapide pendant 40 minutes, au cours de laquelle, le sable aidant, le mycélium est complètement mis en pièce. L'extrait chloroformique filtré sur sulfate de sodium anhydre sert après dilutions successives à la chromatographie. Dans le cas des espèces peu caséolytiques, une centrifugation à 8 000 tours, pendant 5 minutes est nécessaire avant de recueillir un filtrat limpide. L'opération peut être pratiquée à partir de cultures en tubes de 22 millimètres de diamètre : il suffit, alors, de doubler les quantités de sable et de chloroforme.

Cette méthode simple remplace avantageusement les encombrantes cultures en boîtes de Roux sur milieux solides variés, suivies d'extractions fastidieuses nécessitant de nombreuses manipulations. Elle permet d'éprouver en série de nombreuses souches (l'appareil pouvant recevoir 160 tubes) et peut être employée à des fins aussi diverses que l'étude de l'influence de la température, la composition du milieu et de son pH. Les résultats, du point de vue quantitatif, sont meilleurs pour le même nombre de jours de culture que ceux obtenus par développement stationnaire du mycélium en flacons d'Erlenmeyer ou en boîtes de Roux, ou que ceux acquis après culture en fermenteur : l'agitation et l'insufflation trop vive d'air ont pour effet de dilacérer les hyphes.

D. — *RELATION ENTRE ACIDE KOJIQUE ET FLAVATOXINE*

L'acide kojique, métabolite de la plupart des souches d'*Aspergillus* du groupe *flavus* jouerait d'après Heathcote et Child un rôle important dans la synthèse de la flavatoxine et de la stérigmatocystine (33). Ces composés possédant un noyau déhydrofurane pourraient dériver d'un précurseur similaire;

l'acide kojique occuperait cette position clé. Non seulement, il est utilisé comme source de carbone par les souches atoxinogènes et toxinogènes, en remplacement d'un glucide dans la formule de Czapeck-Dox, mais sa présence dans un milieu neutre oriente le métabolisme des souches toxinogènes vers une synthèse lente et réduite de flavatoxine comme le montre le tableau XIII où sont intervenues 20 souches de chaque type; et provoque des aberrations des appareils végétatifs et fructifères (voir fig. 8).

TABLEAU XIII

Influence de l'acide kojique sur la synthèse de flavatoxine

		Souches toxinogènes		Souches atoxinogènes	
	Milieu	Mycélium	Flavatoxine	Mycélium	Flavatoxine
Formule minérale de Czapeck-Dox + . .	Saccharose 3 % . . .	+	—	+	—
	A. kojique 1 à 3 % .	±	+	±	—
	Saccharose 3 % et acide kojique 0,6 % . . .	++	+	++	—
	Saccharose 0,6 %, lait 80 %	+++	++	+++	—

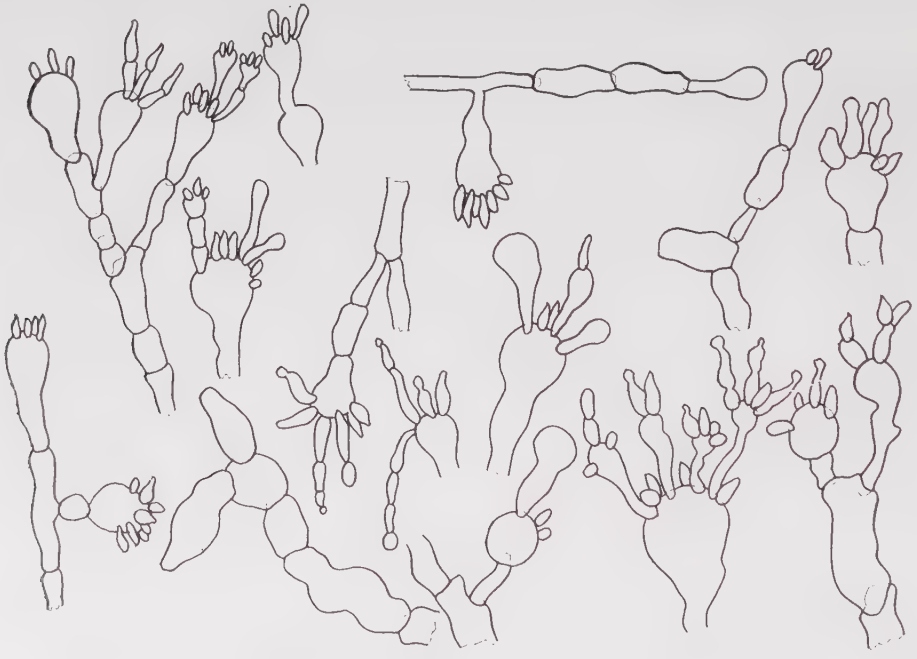


Fig. 8. Culture d'*A. parasiticus* sur Czapeck-Dox avec 0,3 % d'acide kojique en tube roulant. Aberrations des appareils végétatif et sporifère (G. × 1 000 env.).

Pour *Aspergillus parasiticus* très toxinogène, les résultats sont les suivants par culture en fiole de Roux (le premier chiffre indique le poids en mg de mycélium sec, le second, le taux de flavatoxine après 6 jours de culture). En outre, les variétés très toxiques *A. parasiticus* ou *A. flavus* Fort-Lamy sécrètent des quantités énormes d'acide kojique, supérieures à 2 g/l.

TABLEAU XIV

PRODUCTION DE FLAVATOXINE PAR *A. parasiticus* EN PRÉSENCE D'ACIDE KOJIQUE

MILIEU DE CULTURE	POIDS DU MYCÉLIUM SEC (en mg)	QUANTITÉ DE FLAVATOXINE PRODUITE (en µg/l)
Milieu de Czapeck Dox saccharose	157	±
Milieu de Czapeck Dox saccharose + 0,6 % acide kojique .	514	10
Milieu minéral de Czapeck Dox à 0,6 % acide kojique .	17	5
Milieu minéral de Czapeck Dox à 3 % acide kojique . .	55	600

D'autre part, si l'inverse n'est pas vrai, toutes les souches d'*A. flavus* toxinogènes sont productrices d'acide kojique. Un autre *Aspergillus*, *A. wentii* dont nous avons montré (42) qu'il produisait de petites quantités de poison, était lui-même sécréteur de ce précurseur possible. Il semble bien que l'acide kojique intervient dans cette réaction de synthèse, mais notre position sera plus nuancée que celle des auteurs américains : d'abord, parce qu'il n'interfère vraisemblablement jamais seul, la sécrétion de l'un étant parallèle à l'excrétion de l'autre; ensuite, parce que la présence de l'acide kojique peut donner lieu au sein du substrat à des réactions chimiques dont les résultants pourraient eux-mêmes opérer.

E. — *EFFETS BIOLOGIQUES DE LA TOXINE*

L'effet biologique de la flavatoxine se traduit soit par un dysfonctionnement hépatique aboutissant dans la plupart des cas à un hépatome, soit pour des doses massives, par un effet létal. Limitées d'abord aux animaux, puis à l'œuf de poule (75, 105), les expériences se sont, ensuite, étendues à d'autres formes de vie embryonnaire, en particulier les œufs et larves (32, 102). De leur côté, BURMEISTER et coll. (14), LILLEHOY et coll. (55), CLÉMENTS (22) abandonnant les formes pluricellulaires organisées, vont s'adresser au groupe des êtres microscopiques : algues, champignons, protozoaires, bactéries, sur lesquels ils pratiqueront les essais de toxicité décelant des propriétés antibactériennes de la flavatoxine notamment vis-à-vis des Bacillales.

C'est sur une eubactériale sporulée de ce groupe, *Bacillus stearothermophilus*

que le pouvoir toxique du métabolite d'*A. flavus* a été mis en évidence par nous suivant la technique développée ci-dessous :

a) Préparation du germe test

Ensemencé dans la masse d'une gélose nutritive, coulée en boîte de Pétri sous une faible épaisseur suivant la méthode de Galesloot et Hassing (31), il peut être conservé à + 4 °C pendant un mois, ce qui dispense des ensemencements de dernière minute.

b) Préparation de la toxine et résultats

Quelle que soit son origine, elle est, avant d'être mise en contact avec la bactérie test, purifiée par chromatographie en couche mince; après séchage de la plaque, elle est repérée sous la lampe à U-V; la poudre de gel de silice à laquelle elle est liée, est détachée par grattage au fil de verre du reste du chromatogramme puis déposée sur la plus petite étendue possible (diamètre 5 à 8 mm), à la surface de la gélose ensemencée. Une fraction identique, mais non fluorescente du gel de silice parcouru par le solvant, subit la même opération.

Les boîtes sont abandonnées 1/2 heure à 20 °C pour permettre la prédiffusion de la toxine puis incubées 3 heures à 55 °C. La présence d'une dose de toxine B égale à 50 µg se traduit par une auréole d'inhibition. En bordure de la zone d'inhibition, des formes représentées par des cellules hypertrophiées à cytoplasme peu coloré ou au contraire très granuleux ont été observées. Elles sont comparables à celles décrites par Wragg et coll. (109) sur *Escherichia coli*, par Lillehoy (55) sur *Flavabacterium aurantiacum* et par Clements sur *Bacillus megaterium* (21), soumis aux mêmes conditions. Plus près du point de dépôt de la toxine, de nombreuses spores n'ont pas germé.

F. — *LES SPORES*

1. Résistance des spores

Les conidiospores des *Aspergillus*, assurant le maintien et la propagation de l'espèce, sont extrêmement résistantes au vieillissement, à l'action des agents physiques et chimiques et aux systèmes enzymatiques.

a) *Vieillissement.* — Des spores appartenant aux trois espèces pathogènes majeures ensemencées dans du sable de Fontainebleau stérile, puis séchées et conservées à + 4 °C ont donné naissance, après imprégnation du substrat tellurique par un milieu nutritif liquide, à des hyphes mycéliens et à des appareils sporifères, ceci après 14 mois pour *A. flavus*, 16 mois pour *A. fumigatus*, 26 mois pour *A. clavatus*.

b) *Antiseptiques et colorants.* — L'action de quelques antiseptiques et colorants sur le pouvoir germinatif des spores d'*A. clavatus* a été envisagée dans une publication antérieure (9). Les propriétés inhibitrices et fongicides de certains de ces produits vis-à-vis des conidiospores d'*A. flavus* et d'*A. fumigatus*, espèces plus thermophiles, sont précisées dans le tableau XV. La non-efficience d'une substance inhi-

TABLEAU XV

POUVOIR FONGISTATIQUE ET FONGICIDE DES COLORANTS SUR LES SPORES ET LE MYCÉLIUM D'*A. flavus* ET D'*A. fumigatus*

COLORANT	POUVOIR FONGISTATIQUE		POUVOIR FONGICIDE							
	A. fumigatus	*A. flavus*	*A. fumigatus*				*A. flavus*			
			Spores		Mycélium		Spores		Mycélium	
Cristal violet	1 /40 000	1 /40 000	—		1 /500 1 /1 000	6 h 2 h	0		1 /1 000	6 h
Vert brillant	1 /40 000	1 /40 000	1 /200 1 /500	1 h 18 h	1 /200 1 /1 000	1 h 24 h	1 /200 1 /500	6 h 18 h	1 /200 1 /1 000	6 h 24 h
Vert malachite	1 /40 000	1 /40 000	1 /200 1 /500	1 h 6 h	1 /500 1 /1 000	60′ 18 h	1 /200 1 /500	1 h 6 h	1 /500 1 /500	1 h 6 h
Vert de méthyle	1 /40 000	1 /40 000	0		1 /500	6 h	0		1 /500	6 h
Violet dahlia	1 /2 000	1 /2 000	1 /100	24 h			1 /100	24 h	1 /1 000	18 h
Bleu victoria	1 /5 000	1 /5 000	0		1 /500	24 h	0		1 /500	24 h
Violet de gentiane	1 /500	1 /1 000	0		0				1 /500	24 h
Vert de méthyle	—	1 /1 000	0		0		0		0	
Vert d'iode		1 /500	0		0		0		0	
Bleu alizarine	1 /20 000	1 /2 000	1 /200 1 /500	6 h 18 h	1 /200 1 /1 000	6 h 18 h	1 /100	24 h	1 /500 1 /1 000	6 h 24 h
Thionine	1 /500	1 /500								

Sont sans effet à ces concentrations : Bleu d'aniline, violet de crésyl, fuchsine, bleu de méthylène, bleu coton, bleu de toluidine.

bitrice est notée pour des concentrations maximales de 1 /500. De la même manière, et pour des concentrations inférieures à 1 /200, le pouvoir fongicide a été constaté, à la fois pour les spores et le mycélium. Le pouvoir germinatif des spores est arrêté à partir de 10 p. 100 de chlorure de sodium pour *A. fumigatus*, de 11 p. 100 pour *A. flavus* et de 9 p. 100 pour *A. clavatus*.

c) *Antifongiques.* — L'utilisation abusive des antibiotiques courants développe depuis quelques années un déséquilibre net entre la mycoflore et les bactéries au profit de la première : soit chez les organismes vivants (recrudescence des mycoses animales et humaines, bénignes ou profondes, des surinfections secondaires), soit dans les aliments composés et les compléments d'engraissement (pollution intensive par les spores fongiques [29]). La découverte des antifongiques naturels ou de synthèse apportera peut-être une solution à un problème qui devient crucial. Parmi ceux-ci nous avons déjà établi que le thiabendazole montre une efficience réelle contre la plupart des *Aspergillus* (9).

Il était intéressant de savoir si la sensibilité comparée des souches vis-à-vis de ce fongicide permet d'établir une discrimination entre souches toxinogènes et atoxinogènes (tabl. XVI).

TABLEAU XVI

Activité fongistatique et fongicide du thiabendazole sur les espèces des groupes *flavus*, *clavatus* et *fumigatus*

Groupe	Espèce	Pouvoir toxinogène	Concentration inhibitrice (en mcg /ml)	Concentration fongicide (en mcg /ml)
A. clavatus	*A. clavatus* (Littry, Valois, Gateau (Caen). Kew, ATCC, Fristole (Caen)	Flavatoxine 0 Clavatoxine + ou —	Plus de 1 000	Plus de 1 000
A. fumigatus	*A. fumigatus* E 1940	Flavatoxine 0	50	100
	A. fumigatus LD	0	10	100
	A. fischeri		Plus de 1 000	Plus de 1 000
A. flavus	*A. flavus* Madagascar	+ + (B)	5	10
	A. flavus Fort Lamy	+ + + (B)	1	50
	A. flavus Gabon I	+ (B)	1	50
	A. flavus Batista	0	1	10
	A. flavus entomophage I	± (B)	5	50
	A. flavus entomophage II	0	5	50
	A. flavus Belleville	0	5	50
	A. flavus Cameroun	0	1	50
	A. flavus Café	+ (B)	5	50
	A. columnaris	0	5	50
	A. zonatus	0	Inférieure à 1	Inférieure à 1
	A. parasiticus	+ + + (B et G)	1	50
	A. effusus	0	5	50
	A. oryzæ Corée	0	5	50
	A. flavo-furcatis	0	5	50

L'extrême résistance des spores d'*A. clavatus* et d'*A. fischeri* représente un accident parmi les espèces du genre *Aspergillus*. Le caractère ne paraît pas lié, pour *A. fischeri*, à la présence d'ascopores : les espèces à cléistothèces, comme *A. glaucus*, montrent, au contraire, une grande sensibilité au thiabendazole. Signalons la faible sensibilité des spores d'*A. clavatus* à la nystatine (1/200). Pour une espèce donnée, il n'y a aucune relation entre le pouvoir toxinogène et une quelconque sensibilité à cet antifongique : il existe des souches plus sensibles, d'autres plus résistantes, qu'elles soient toxinogènes ou non, douées ou non, d'un pouvoir pathogène ou parasitaire.

Grâce à ses propriétés antifongiques puissantes sur les autres moisissures et sur certaines espèces d'*Aspergillus*, le thiabendazole nous a permis de réaliser un milieu sélectif destiné à isoler des substrats les plus divers les deux espèces résistantes, et, en particulier *A. clavatus* (44). Incorporé au milieu de Czapeck-Dox modifié, par le remplacement du saccharose par l'amidon de pomme de terre, au taux de 100 mcg/ml, le thiabendazole provoque cependant un allongement du temps de latence; il empêche la germination des spores vieillies d'*A. clavatus* à des concentrations 20 fois inférieures à la dose normalement inhibitrice.

2. Toxicité des spores

Douées chez certaines espèces d'un pouvoir infectieux étonnant, ces organites vont jouer un rôle de premier plan en pathologie, non seulement en tant qu'agent vecteur d'hyphes parasitaires — comme c'est le cas pour *A. fumigatus*, beaucoup plus rarement pour *A. flavus* — mais aussi par leur présence en tant qu'allergènes ou porteurs de toxine (44).

a) *Pouvoir pathogène naturel.* — L'asthme aspergillaire, certaines bronchites n'ont pas d'autre origine que ces minuscules corps figurés. Après avoir travaillé durant plusieurs mois sur *A. clavatus* se développant à la surface des céréales, nous avons nous-même manifesté une allergie aux spores de cette espèce, dont les symptômes, sans être graves, n'en étaient pas moins gênants : éternuements intenses, en série, même pendant la nuit; chatouillements désagréables au niveau des narines en fin de journée; démangeaison de la partie postérieure de la voûte du palais accompagnée de rhinite irritative et de larmoiement.

Nous avons reproduit la plupart de ces symptômes sur des lapins qui ingéraient des aliments contaminés (45).

Récemment (1968), il nous a été donné de suivre une « épizootie » à *A. flavus* dans un élevage de drosophiles. Ces dernières mouraient très rapidement et des hyphes mycéliens étaient reconnus à la surface des téguments et dans les tissus internes des adultes et des pupes. Dans la cavité médullaire de l'une de celles-ci, nous avons observé une tête aspergillaire typique. Ces appareils conidiens sont surtout visibles dans la partie postérieure du corps de l'insecte, d'où ils émergent à la jointure des téguments. Les brosses des ailes et des pattes sont littéralement bourrées de spores. Quelques hyphes rampants couvrent la cuticule. Il semble que ce soit l'action conju-

guée du mycélium et de la toxine qui ait provoqué la destruction de cet élevage. Nous avons, en effet, isolé des souches toxinogènes des drosophiles mortes, alors que le milieu de culture à base de farine de maïs et de levure séchée renfermait lui-même des doses variables de toxine, suivant les flacons. La composition du milieu, l'incubation à une température de l'ordre de 25 °C constituent des conditions parfaitement favorables au développement du mycélium et à la synthèse du poison. Chacun des ingrédients du mélange de départ est parfaitement sain : la pollution par la toxine a bien lieu *in situ*; elle est donc sécrétée par les hyphes qui se développent.

Ce sont les bouchons de coton qui, transportés d'une fiole à l'autre sans stérilisation préalable ensemencent cette moisissure. L'application de ces tampons d'ouate à la surface du milieu de Czapeck coulé en boîte de Pétri a donné naissance à une culture pure d'*A. flavus*. Pour certains lots, cependant, la culture met en évidence la présence simultanée d'*A. flavus* et d'*A. niger*. Ce mode d'action n'est pas sans rappeler les constatations de Foote (28) au sujet des abeilles du Sud des U.S.A. et de la Californie, et la crainte qu'il exprime de voir leur nombre diminuer peut-être jusqu'à disparition complète, sous l'influence des *A. flavus* toxinogènes dont il isola plusieurs souches du miel de ces régions. Plusieurs échantillons de ce produit récolté en Basse-Normandie ont été examinés au laboratoire; ils se sont révélés exempts de flavatoxine et de spores d'*A. flavus*.

b) *Pouvoir pathogène expérimental.* — La voie d'inoculation intraveineuse semble représenter un mode assez fréquemment employé pour la pénétration de tels agents infectants dans un organisme sain. Le lapin a été choisi comme animal test; l'injection de spores en phase aqueuse (40 à 50 millions dans l'eau physiologique) est faite dans la veine marginale de l'oreille.

TABLEAU XVII

Évolution comparée de 3 mycoses expérimentales

	A. clavatus	*A. fumigatus*	*A. flavus*
Symptômes	Cinq jours après, apparaît une légère protubérance avec rougeur et inflammation qui évolue vers le 8e jour en 1 module de 2 cm de diamètre formé d'un pus blanc jaunâtre	Cinq jours après l'inoculation l'animal craintif se tient très cambré, animé de profonds tremblements. Il se déplace difficilement, les yeux sont hagards	Dès le 8e jour inappétence; le 21e jour la colonne vertébrale devient saillante. Puis l'animal cachectique est frappé le 40e jour par une dyspnée légère. Il boit souvent et montre une diarrhée intermittente
Mort		8 à 10 jours	50 à 80 jours
Autopsie	Infection très localisée	Septicémie avec abcès très nombreux sur le péritoine, les reins surtout les poumons, le muscle cardiaque	Reins gonflés, anormalement décolorés, portant des modules de pus jaunâtre. La vessie dilatée contient un liquide caséeux

TABLEAU XVIII

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES ESPÈCES DES GROUPES *flavus*, *clavatus* ET *fumigatus*

GROUPES	ESPÈCES	SPORES	CLEISTOTHÈCES	SCLÉROTES	RÉSISTANCE AU THIABENDAZOLE (µg/ml)	CATALASE	AMYLASES (*)	PROTÉASES (*)	LIPASES	ACIDE KOJIQUE	FLAVATOXINE
A. clavatus	*A. clavatus*	lisse	—	—	plus 1 000	+	+++	++	+	3/7	0/7
A. fumigatus	*A. fumigatus*	ornée	—	—	10 à 50	+	++ (37) ± ou +(20)	++(37) +(20)	±	0/2	0/2
	A. fischeri	ornée	+	—	plus 1 000	+	±	+(20 et 37)	±	0/1	0/1
A. flavus	*A. flavus*	rugueuse	—	+	1 à 5	+	++(30)+(20)	+++(30 et 20)	++	173/174	72/174
	A. parasiticus	rugueuse	—	—	1	+	++(30)	+++(30 et 20)	++	3/3	3/3
	A. columnaris	petite	—	—	5	+	+++(30 et 20)		+	2/2	0/2
	A. zonatus	rugueuse	—	—	inf. à 1	+	± (30 et 20)	—(30 et 20)	—	1/1	0/1
	A. oryzæ	grande taille	—	—	5	+	+++(30 et 20)	+++(30 et 20)	++	19/19	0/19
	A. effusus	—	—	—	5	+	+++ 30 et 20	+++(30 et 20)	++	2/2	0/2
	A. flavofurcatis	—	—	—	5	+	++(30 et 20)	+++(30 et 20)	+	1/1	0/1

(*) Les chiffres des colonnes 8 et 9 indiquent les températures d'incubation en °C.

Nous résumerons succinctement dans un tableau (XVII) l'évolution comparée de ces 3 « mycoses » expérimentales. L'étude anatomo-pathologique, histologique et immunologique sera détaillée ultérieurement.

IV. — DISCUSSION

La systématique des *Aspergillus* gagnerait à sortir des critères morphologiques exploités jusqu'à maintenant pour la diagnose des espèces; une nouvelle « panoplie de signes » beaucoup plus large — d'ordre physiologique, biochimique, immunologique et même ultra microscopique — pourrait être attribuée à chaque espèce : la notion de groupe éclaterait (*). Elle ne conserverait qu'un nombre réduit des pièces du puzzle, communs à la mosaïque assignée spécifiquement. Le « plus grand commun diviseur » de l'ensemble de ses caractères définirait parfaitement le genre *Aspergillus*. L'immunologie, en particulier, pourrait préciser la marqueterie antigénique de chaque espèce, de chaque groupe et en exploiter les communautés et les divergences.

Un autre problème très délicat nous paraît être celui de la toxinogenèse, que nous avions évoqué pour (8) *A. clavatus*, il y a quelques années. Cette faculté, très diversement représentée dans une espèce donnée et plus encore dans un groupe, paraît constituer en soi un caractère propre, indépendant, unique. Il n'est, en effet, ni lié à un autre caractère morphologique — il n'y a pas de différence entre souche toxinogène et atoxinogène — ni coordonné à la résistance à tel ou tel antiseptique. D'autre part, il ne semble y avoir aucune relation entre le pouvoir toxinogène et le pouvoir enzymatique. L'activité protéolytique serait peut-être subordonnée pour *A. fumigatus* au pouvoir parasitaire pathogène.

Peut-on préjuger du pouvoir toxinogène à partir du lieu d'isolement de la souche? Là encore, il faut être prudent : il y a des souches toxinogènes en France, d'autres en Afrique et dans les pays tropicaux. Seul, le pourcentage en varie (du simple au double). Il y aurait lieu de dresser une géographie des souches en s'attachant, en particulier, à comparer des régions éloignées mais de même climat (Nord du Brésil et Gabon par exemple). D'autre part, intrinséquement, ce pouvoir d'élaborer la toxine est inégalement réparti suivant l'origine des souches; il est éminemment variable pour une même variété : l'entretien au laboratoire sur milieu synthétique, dans des conditions optimales de développement, induit une dévaluation du toxique, phénomène bien connu des bactériologistes. Non seulement ces perturbations d'ordre physiologique sont sensibles dans le temps — et dans certains cas irréversibles — mais elles peuvent être essaimées dans la descendance directe par l'intermédiaire de chaque conidiospore. Rappelons qu'une seule tête conidienne produit plusieurs millions de ces organites de dispersion (61); la culture monosporée représente, alors,

(*) Le regroupement des individus à grande similitude réciproque sera envisagé suivant la méthode taxonométrique développée par : Kurilowicz (W.), Woznicka (W.) et Gyllenberg (H.). *Rev. Immunol.*, 1969, **33**, 27, pour l'étude des Streptomycètes.

un travail gigantesque, mais elle seule permettrait d'appréhender cette génétique de la toxinogenèse.

Les *Aspergillus* sont des moisissures d'actualité, certes, mais aussi des moisissures d'avenir, douées d'un impressionnant pouvoir de synthèse (enzymes, acides organiques tels qu'acides oxalique et citrique, antibiotiques, toxines); utilisées d'une façon artisanale (koji) ou scientifique (enzymes, médicaments), dans de nombreux domaines qui iront en s'accroissant avec le développement de nouvelles recherches; les *Aspergillus* représentent même avec la flavatoxine « qui restera sans doute comme bien d'autres substances, plus intéressante expérimentalement qu'en clinique humaine (73) », un terrain d'études inépuisable, quelquefois inquiétant mais toujours passionnant.

V. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° Le présent travail porte sur les espèces d'*Aspergillus* appartenant aux trois groupes : *clavatus*, *fumigatus* et *flavus*.

2° Le mycélium de ces *Aspergillus* peut engendrer des formes aberrantes, telles que les sclérotes d'*A. flavus* pour lesquels le sang ajouté au milieu de culture exerce un rôle stimulant. Les corémies ou synnemas constituent des accidents non reproductibles de cette même espèce. Les chlamydospores et pseudochlamydospores d'*A. clavatus*, *A. flavus*, *A. zonatus* sont induites par des substances inhibitrices comme le thiabendazole et à un moindre degré le teepol et les solutions fortement acides ou alcalines.

3° Chez *Aspergillus fischeri*, la température, la composition du milieu, la nature de la source du carbone modifient considérablement l'aspect de la culture et peuvent faire apparaître des cléistothèces. A 20 °C, leur production est plus importante qu'à 37 °C. Les milieux de Sabouraud et de Loewenstein, entre autres, exercent un rôle favorisant. Certains glucides comme le glucose, le maltose, le tréhalose, l'amidon, le glycogène, la cellulose et l'esculine agissent dans le même sens.

A. fischeri ne serait qu'une forme mésophile et saprophyte d'*A. fumigatus* thermophile et pathogène.

4° La synthèse de l'acide kojique par *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. columnaris*, *A. oryzæ*, *A. flavo-furcatis*, *A. clavatus*, est sous l'influence de la nature du glucide : certains de ceux-ci sont fortement stimulants : glucose, fructose, maltose, raffinose, glycogène et sorbitol; d'autres sont sans effet : inuline, lactose.

Le spectre antibactérien de ce composé est plus puissant que celui de l'acide citrique.

Ont été mis au point un procédé rapide de détection des souches productrices ainsi qu'un protocole détaillé de recherche et de titrage de l'acide kojique.

5° L'emploi d'une méthode simplifiée de dosage par diffusion en gélose de quelques hydrolases (lipase, caséinase, gélatinase, amylase) a permis un classement de ces espèces sur le critère de leur activité enzymatique. Une technique de recherche

de la catalase sur tube de culture a montré la présence constante de cette enzyme chez les *Aspergillus*.

6° Après modification des méthodes de dégraissage, d'extraction et de titrage et par utilisation de chromatographies conduites simultanément avec des systèmes de solvants différents, la flavatoxine a été recherchée sur de nombreux produits alimentaires d'origine normande ou tropicale. La répartition est très inégale dans les produits vivriers africains. Ce sont les tourteaux d'arachides et les aliments composés pour les animaux qui se révèlent le plus fortement pollués par ce toxique. Les laits et produits laitiers analysés sont dépourvus de lactoflavatoxine (type M.).

7° La sécrétion de toxine par *A. flavus* est maximale entre 25 et 30 °C. L'amidon soluble, l'amidon de riz, l'amidon de pomme de terre, le cellobiose, le tréhalose et le glycérol sont de bons inducteurs de la toxinogenèse. Parmi les acides aminés, les meilleurs résultats ont été enregistrés avec la proline, la phénylalanine, l'acide glutamique, le tryptophane, l'asparagine, la valine, l'histidine et la méthionine. Toutes les souches étudiées d'*A. clavatus* produisent leur hémolysine et leur antibiotique en présence d'amidon.

8° L'établissement de la composition d'un milieu liquide riche [Milieu de Czapeck-Dox : lait homogénéisé (1 : 4)], l'utilisation d'une culture en tubes roulants, ont permis la reconnaissance en 3 ou 4 jours des souches toxinogènes.

9° Le rapport existant entre les souches toxinogènes et atoxinogènes varie suivant leur origine : il est de 48 p. 100 pour les isolements réalisés à partir de substrats tropicaux, de 23 p. 100 pour les souches recueillies dans notre région, et de 12 p. 100 seulement pour les cultures de mycothèques. La proportion des souches sécrétrices du mélange de flavatoxines B et G ne représente que 7 à 8 p. 100 des formes toxinogènes.

10° L'acide kojique occuperait une position déterminante dans le métabolisme de synthèse de la flavatoxine.

Des faits naturels et expérimentaux viennent à l'appui de cette hypothèse :

a) Toutes les souches toxinogènes (même celle d'*A. wentii*) sont fortement productrices de ce précurseur possible.

b) La présence de ce composé, utilisable même par les souches atoxinogènes en remplacement d'un glucide, stimule la sécrétion du toxique.

11° Un test biologique de toxicité, lisible en 4 heures, utilise les propriétés inhibitrices des flavatoxines vis-à-vis de *Bacillus stearothermophilus*, et permet la détection de 50 μg de toxine.

12° L'étude de la résistance comparée des spores à certaines innibiteurs chimiques, colorants divers et antifongiques, a permis la réalisation d'un milieu sélectif au thiabendazole, servant à l'isolement d'*A. clavatus*.

13° A la suite de l'envahissement accidentel de flacons de culture par les spores et le mycélium d'*A. flavus*, une épizootie doublée d'un empoisonnement par le métabolite sécrété *in situ*, a décimé un élevage de *Drosophila melanogaster*.

VI. — SUMMARY

P. Boutibonnes

Research into the main pathogenic aspergilli

This work presents a study of the species of *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* groups.

The first part of it concerns morphology. The sclerotia of *A. flavus*, induced by the presence of blood; the coremiform clusters of this same species — non-reproductible accidents— the chlamydospora of *A. clavatus* and the cleistothecia of *A. fischeri* are studied there. For the latter, the stress is on the stimulating part of temperature (20 °C), the use of Sabouraud or Loewenstein media, and the action of some glucids such as glucose, maltose, starch and glycogen.

The second part deals with physiological results. A simple method for the detection of the strains able to produce kojic acid is proposed, and a technic of titration by agar diffusion. Thanks to the same process, a titration of hydrolases on filtrates is realised. The obtained results help for a classification of the species according to their enzymatic critera. A methode of extraction and titration of flavatoxin leads to a research in various food samples.

By rolling — tubes cultures on a liquid medium composed of non-skim milk and Czapeck-Dox (4 : 1), the toxic properties of a strain can be appreciated in 3 or 4 days.

A biological test on agar-diffusion, with *Bacillus stearothermophilus* reveals the presence of 50 µg of flavatoxin. An epizootic disease on *Drosophila melanogaster* is described.

(*Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences*, 14-*Caen*.)

BIBLIOGRAPHIE

(1) Abadjieff (W.). — *Mh. Vet. Med.*, 1966, **21**, 452.
(2) Agnihotri (V.). — *Naturwissinschaften Dtsch.*, 1963, **93**, 59.
(3) Arai (T.), Tatsuya (I.) et Yasumasa (K.). — *J. Bact.*, 1967, **50**, 527.
(4) Arnstein (H.) et Bentley (R.). — *Biochem. J.*, 1953, **54**, 493.
(5) Arnstein (H.) et Bentley (R.). — *Biochem. J.*, 1953, **54**, 508.
(6) de Bary (A.). — *Botan. Zeit.*, 1954, **12**, 425, 441 et 464.
(7) Bentley (R.). — *Methodes in enzymology Academic Press*, 1 vol., 1957, 238 p.
(8) Boutibonnes (P.). — Contribution à l'étude de la toxicité d'*Aspergillus clavatus* pour es animaux. Diplôme d'Études supérieures, Caen, 1963.
(9) Boutibonnes (P.). — *Bul. Acad. Vet.*, 1968, **41**, 305.
(10) Boutibonnes (P.) et Jacquet (J.). — *Rev. Immunol.*, 1967, **31**, 293.
(11) Boutibonnes (P.) et Jacquet (J.). — *Bull. Acad. Vet.*, 1967, **40**, 393.
(12) Boutibonnes (P.) et Jacquet (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163**, 118.
(13) Boutibonnes (P.) et Jacquet (J.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1969 (à paraître).
(14) Burmeister (H.) et Hesseltine (C.). — *Appl. Microbiol.*, 1966, **14**, 403.
(15) Busgen (S.). — *Ber. Bot. Ges.*, 1885, **3**, 66.
(16) Buu Hoi (N.) et Ratsimamanga (A.). — *C.R. Acad. Sc.*, 1953, **236**, 341.
(17) Carnaghan (R.), Hartley (R.) et O'Kelly (J.). — *Nature*, 1963, **200**, 1001.
(18) Charpin (J.), Aubert (J.), Charpin (H.), Boutin (C.) et Malea Lauriol (M.). — *Biol. Méd.*, 1968, *LVII*, 201.

(19) Chong (Y.) et Beng (C.). — *Med. J. Malaya*, 1965, **20**, 49.
(20) Christensen (C.), Coutu (C.) et Stevens (F.). — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, 71.
(21) Clements (N.). — *J. of. A.O.A.C.*, 1968, **51**, 611.
(22) Cléments (N.). — *J. of A.O.A.C.*, 1968, **51**, 1192.
(23) Corda (A.). — Icones fungorum hucusque cognitorum, 6 vol., Prague, 1837, 1854.
(24) Engebrecht (R.), Ayres (J.) et Sinnhuder (R.). — *J. of A.O.A.C.*, 1965, **48**, 815.
(25) Eppley (R.). — *J. of A.O.A.C.*, 1966, **49**, 473.
(26) Fischbach (H.). — *Intern. Union of pure and appl. Chem. Inf. Bull.*, 1968, **31**, 35.
(27) Florey (H.), Chain (E.), Heatley (N.), Jennings (M.), Sanders (A.), Abraham (E.) et Florey (M.). — Antibiotics Oxford Med. Pub. 2 vol., Londres, 1949.
(28) Foote (L.). — *Amer. Bee J.*, 1966, **106**, 126.
(29) Forgacs (J.). — Mycotoxicoses Proceedings 1962 Maryland nutrition conference for food Manufactures.
(30) Fresenius (G.). — *Beitr. z. Mykologie, Brôner Ed. Frankfurt*, 1850 à 1863.
(31) Galesloot (T.) et Hassing (F.). — *Nether. Milk Dairy J.*, 1962, **16**, 189.
(32) Gudauskas (R.). — *J. Invert.*, 1967, **9**, 123.
(33) Heathcote (J.), Child (J.) et Dutton (M.). — *Biochem. J.*, 1965, **95**, 23.
(34) Hedge (U.), Chandra (T.) et Shanmugasundaram (E.). — *Canc. J. comp. Med.*, 1967, **31**, 160.
(35) Hiscocks (E.) et Raymond (W.). — *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1964, **41**, 224.
(36) Hull (R.). — *New. Scient.*, 1967, **33**, 158.
(37) Hunt (W.), Broders (A.), Stinson (J.) et Carabasi (R.). — *Am. rev. respir. Des.*, 1961, **83**, 886.
(38) de Iongh (H.), Vles (R.) et de Vogel (P.). — Mycotoxine in foodstuffs M.I.T. Press., 1965, 235.
(39) Jacquet (J.) et Boutibonnes (P.). — *C.R. Acad. Agric.*, 1963, **49**, 368.
(40) Jacquet (J.) et Boutibonnes (P.). — *Bull. Acad. Vet.*, 1967, **40**, 169.
(41) Jacquet (J.) et Boutibonnes (P.). — *Bull. Acad. Vet.*, 1967, **40**, 489.
(42) Jacquet (J.) et Boutibonnes (P.). — *Bull. Acad. Nat. Med.*, 1967, **151**, 560.
(43) Jacquet (J.) et Boutibonnes (P.). — *C.R. Acad. Agric.*, 1967, **52**, 1244.
(44) Jacquet (J.) et Boutibonnes (P.). — *Rev. Immunol.*, 1969, **33**, 47.
(45) Jacquet (J.), Boutibonnes (P.) et Cicile (J.). — *Bull. Acad. Vet.*, 1963, **36**, 199.
(46) Jacquet (J.) et Steeg (L.). — *C.R. Acad. Agric.*, 1952, **39**, 609.
(47) Kal'vish (T.). — *Vest. Lening. Univ.*, 1963, **21**, 160.
(48) Krogh (P.) et Hasselager (E.). — *Arrsskr K. Vet. Landlohojsk*, 1966, 126.
(49) Lafont (P.) et Frayssinet (C.). — C.R. 16e Cong. Nutr. Hambourg, 1966.
(50) Lafont (P.) et Lafont (J.). — *Ann. Inst. Past.*, 1969, **116**, 243.
(51) Lapcevic (E.) et Ciric (V.). — *Vet. Glassnik*, 1963, **107**, 105.
(52) Le Branchu (M.). — Thèse de Médecine, Rennes, 1964, 1 vol.
(53) Lee (W.). — *The Analyst*, 1965, **90**, 305.
(54) Lijinski (W.) et Butler (W.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **123**, 151.
(55) Lillehoy (E.), Ciegler (A.) et Hall (H.). — *Canad. J. Microbiol.*, 1967, **13**, 629.
(56) Link (H.). — *Geselch. Naturforsc. Fr. Berlin Mag.*, 1809, **3**, 1.
(57) Macartney (J.). — *Thorax*, 1964, **19**, 287.
(58) Matsumara (F.) et Knight (S.). — *J. of econ. entomol.*, 1967, **60**, 871.
(59) Micheli (P.). — Nova Plantarum Genera juxta Tournefortii methodum disposita 1729, Florence.
(60) Moreau (C.) et Moreau (M.). — *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, 1959, **75**, 72.
(61) Moreau (C.) et Moreau (M.). — *C.R. Acad. Sc.*, 1960, **251**, 1556.
(62) Moreau (F.). — Les champignons. Paul Lechevalier, éd. Paris, 1953.
(63) Moreau (F.) et Moreau (Mme). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 1939, **11**, 211.
(64) Murakami (H.), Takase (S.) et Kuwabara (K.). — *J. Gen. Appl. Microb.*, 1968, **14**, 97.
(65) N... — *Trop. Prod. Inst.*, 1962, Report 36/62.
(66) N... — *Trop. Prod. Inst.*, 1962, Report 25/62.
(67) N... — Changes in methods. *J. of A.O.A.C.*, 1966, **49**, 229.
(68) Nabney (J.) et Nessbitt (F.). — *Analyst*, 1965, **90**, 155.
(69) Nakata (K.). — *Bull. Sc. Fakult Terkult Kjum. Imp. Univer.*, 1925, **1**, 177.
(70) Nikov (S.), Simov (I.), Koroleva (V.) et Zhelev (V.). — *Nauch. Trud. Vissh vet. Med. Inst.*, 1965, **15**, 169.
(71) Parker (W.) et Melnick (D.). — *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1966, **43**, 635.
(72) Parrish (F.), Wiley (B.), Simmons (E.) et Long (L.). — *Appl. Microb.*, 1966, **14**, 139.
(73) Payet (M.). — In Cliniques africaines, 1 vol., Gauthiers-Villard, éd., Paris, 1966.
(74) Pelhate (J.). — *Bull. Inf. St. exp. av. Ploufragan*, 1967, **7**, 26.
(75) Platt (B.), Stewart (R.) et Gupka (R.). — *Proc. Nutr. Soc.*, 1962, **30**, 21.
(76) Pore (R.) et Larsh (H.). — *Mycologia*, 1967, **59**, 318.
(77) Prescott (S.) et Dunn (C.). — Mc. Graw Hill Book Cy N.Y., 1 vol., 1959.
(78) Proctor (B.) et Parker (B.). — *J. Bacteriol*, 1938, **36**, 180.
(79) Rai (J.), Tewari (J.) et Mukerji (K.). — *Canad. J. of Bot.*, 1964, **42**, 1521.

(80) Raper (K.) et Fennell (D.). — The genus Aspergillus. Williams et Wilkins, ed., 1 vol., Baltimore, 1965.
(81) Ravey (R.). — Thèse de Médecine, Nancy, 1 vol., 1965.
(82) Rayer et Montagne — *J. Inst. Paris*, 1842, 270.
(83) Richou (R.), Quinchon (C.) et Pantaleon (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1960, **251**, 283.
(84) Robbins (W.) et Kavanagh (F.). — *Am. J. Bot.*, 1938, **XXV**, 229.
(85) Rudolf (E.). — *Amer. J. Bot.*, 1962, **49**, 71.
(86) Rutqvist (L.). — *Acta. Vet. Scand.*, 1965, **6**, 224.
(87) Saito (K.). — *Bot. Mag. Tokyo*, 1907, **21**, 249.
(88) Sargeant (K.), O'Kelly (J.), Carnaghan (R.) et Allcroft (R.). — *Vet. Rec.*, 1961, **73**, 1219.
(89) Sargeant (K.), Sheridan (A.), O'Kelly (J.) et Carnaghan (R.). — *Nature*, 1961, **192**, 1096.
(90) Schoental (R.). — *Bull. Org. mond. Santé*, 1963, **29**, 823.
(91) de Scott (B.). — *S. Afr. Med. J.*, 1965, **39**, 767.
(92) Seguy (E.). — Code universel des couleurs. Paul Lechevallier éd., Paris, 1 vol., 1936.
(93) Senser (F.). — *Deutsch. Lebens. Runds.*, 1967, **63**, 140.
(94) Specht (H.). — *Zbl. Bakt. Parasit. Infect. Krankh. Hyg.*, 1957, **110**, 540.
(95) Takamine (J.). — *Ind. Eng. Chem.*, 1914, **6**, 824.
(96) Thatcher (S.), Coutu (C.) et Stevens (F.). — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, 71.
(97) van Thieghem (P.). — *Bull. Soc. Bot.*, 1877, **24**, 96, 157 et 203.
(98) Thom (C.) et Church (M.). — The *Aspergillus*. Williams et Wilkins éd., 1 vol., Baltimore, 1926.
(99) Thom (C.) et Raper (K.). — A manual of the *Aspergilli*. Williams et Wilkins éd., 1 vol., Baltimore, 1945.
(100) Thornton (R.), Shirley (G.) et Salisbury (R.). — *N.Z. J. Agric. Res.*, 1968, **11**, 1.
(101) Tilden (E.), Freeman (S.) et Lombard (L.). — *Mycopathologia*, 1963, **20**, 253.
(102) Tomov (A.). — *Vet. Med. Nauki Sofia*, 1965, **2**, 997.
(103) Towsley (P.) et Lee (E.). — *J. of A.O.A.C.*, 1967, **50**, 361.
(104) Tran Vanky (P.), Havez (R.), Biguet (J.) et Leys (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **110**, 86.
(105) Verrett (M.), Marliac (J.) et Mc. Laughlin (J.). — *J. of A.O.A.C.*, 1964, **47**, 1003.
(106) Van der Waltt (J.). — Symposium of Mycotoxins in foodstuffs, 1 vol., Pretoria, 1965.
(107) Wehmer (C.). — *Mem. Soc. phys. hist. natur.*, 1903, **33**, 1.
(108) Wilhelm (K.). — Beitrage zur Kenatiss der Pilzgatting Asperg. Inang. Dis. Berlin, 1877.
(109) Wragg (J.), Ross (V.) et Legator (M.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 1052.
(110) Yabuta (T.). — *Org. Comm. 8th Int. Cong. appl. Chem.*, 1912, **25**, 455.
(111) Yabuta (T.). — *J. Coll. Agric. Tokyo*, 1912, **5**, 51.